



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 C12N 15/12, 15/63, C12Q 1/02, C12P 21/08, C07K 14/705, 16/28, C12N 1/21, 1/19, 5/12</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/33978</p> <p>(43) 国際公開日 1999年7月8日 (08.07.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/05967</p> <p>(22) 国際出願日 1998年12月25日 (25.12.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/361187 1997年12月26日 (26.12.97)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 萬有製薬株式会社 (BANYU PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP] 〒103-8416 東京都中央区日本橋本町2丁目2番3号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 板谷 啓 (ITADANI, Hiraku) [JP/JP] 滝村 哲雄 (TAKIMURA, Tetsuo) [JP/JP] 中村 隆男 (NAKAMURA, Takao) [JP/JP] 太田 雅貴 (OHTA, Masataka) [JP/JP] 〒300-2611 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所内 Ibaraki, (JP)</p>	<p>(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54) Title: NOVEL GUANOSINE TRIPHOSPHATE (GTP)-BINDING PROTEIN CONJUGATE TYPE RECEPTOR PROTEINS</p> <p>(54) 発明の名称 新規なグアノシン三リン酸 (GTP) 結合タンパク質共役型のレセプタータンパク質</p> <p>(57) Abstract A full-length cDNA encoding a rat G protein conjugate type receptor protein which is isolated by screening cDNA libraries originating in rat thalamus and hypothalamus; and human cDNA corresponding to the above rat cDNA. Use of these G protein conjugate type receptor proteins makes it possible to screen ligands and to screen compounds which are candidates for drugs capable of regulating signal transduction from receptors.</p>		

(57)要約

ラット視床及び視床下部由来のcDNAライブラリーのスクリーニングを行うことにより、ラットGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードする全長cDNAを単離した。さらに、得られたラットcDNAに対応するヒトcDNAを単離した。これらGタンパク質共役型レセプタータンパク質を利用することにより、リガンドのスクリーニングやレセプターからのシグナル伝達を調節する医薬品候補化合物のスクリーニングを行うことが可能である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノールウェー	ZW	ジンバブエ
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュー・ジーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	FZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア		セントルシア				

明細書

新規なグアノシン三リン酸 (GTP) 結合タンパク質共役型 のレセプタータンパク質

技術分野

本発明は、新規なグアノシン三リン酸結合タンパク質共役型のレセプタータンパク質、該タンパク質をコードするDNA、並びにこれらを利用した医薬品候補化合物のスクリーニング方法に関する。

背景技術

多くのホルモンや神経伝達物質は細胞膜に存在する特異的なレセプタータンパク質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプタータンパク質の多くは共役しているグアノシン三リン酸結合タンパク質(以下、「Gタンパク質」と略称する場合がある)の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行なっている。このため、このレセプタータンパク質はGタンパク質共役型レセプタータンパク質と総称されている。あるいは7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、7回膜貫通型レセプタータンパク質とも総称されている。

Gタンパク質共役型レセプタータンパク質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら生体の細胞や臓器の機能を調節する分子、例えばホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として非常に重要な役割を担っている。このため、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質は医薬品開発の標的として非常に注目されている。

Gタンパク質共役型レセプタータンパク質としては、これまでにムスカリン性アセチルコリン・レセプターM1、M2、M3、M4 (Peralta, E. G. et al., EMBO J. 6, 3923-3929 (1987))、ムスカリン性アセチルコリン・レセプターM5 (Bonner, T.

I. et al., Neuron 1, 403-410 (1988))、アデノシン・レセプターA₁ (Libert, F. et al., Science 244, 569-572 (1989))、 α 1Aアドレノレセプター (Bruno, J. F. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 179, 1485-1490 (1991))、 β 1アドレノセプター (Frielle, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7920-7924 (1987))、アンジオテンシン・レセプターAT₁ (Takayanagi, R., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 183, 910-916 (1992))、エンドセリン・レセプターET_A (Adachi, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 180, 1265-1272 (1991))、ゴナドトロピン放出因子レセプター (Kaker, S. S. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 189, 289-295 (1992))、ヒスタミン・レセプターH₂ (Ruat, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1658-1672 (1990))、神経ペプチドYレセプターY₁ (Larhammar, D. et al., J. Biol. Chem. 267, 10935-10938 (1992))、インターロイキン8・レセプターIL8R_A (Holmes, W. E. et al., Science 2563, 1278-1280 (1991))、ドーパミン・レセプターD₁ (Mahan, L. C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2196-2200 (1990))、代謝型グルタミン酸レセプターmGluR1 (Masu M. et al., Nature 349, 760-765 (1992))、ソマトスタチン・レセプターSS₁ (Yamada Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 251-255) などが報告されている (参考文献: Watson, S. and Arkininstall, S., The G-Protein Linked Receptor FactsBook, Academic Press (1994))。また、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質を標的とした医薬品としては、塩酸テラゾシン (血圧降下剤、 α 1アドレノセプター・アンタゴニスト)、アテノロール (不整脈用剤、 β 1アドレノセプター・アンタゴニスト)、塩酸ジサイクロミン (鎮痙剤、アセチルコリン・レセプター・アンタゴニスト)、塩酸ラニチジン (消化性潰瘍治療剤、ヒスタミン・レセプターH₂・アンタゴニスト)、塩酸トラゾドン (抗うつ剤、セロトニン・レセプター5-HT_{1B}・アンタゴニスト)、塩酸ブプレノルフィン (鎮痛剤、オピオイド・レセプター κ ・アゴニスト) などが開発されている (参考文献: Stadel, J. M. et al., Trends Pharm.

Sci. 18, 430-437 (1997); 医薬品要覧第5版、薬業時報社)。

ところで、脳の一部である視床下部は、自律神経系の中樞として特定の反応を引き起こす種々のプログラムを有しており、様々な出力系を介して内部環境の恒常性に寄与している。例えば、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、性腺刺激ホルモン放出ホルモン、成長ホルモン放出ホルモンなどのホルモンを放出し、標的細胞に発現している特異的な受容体に対するこれらホルモンの作用を介して、全身の内分泌系を調節している。このような視床下部における出力系には、視床下部における受容体とそれに作用する物質が関与していると考えられている。このため、視床下部の出力系を調節している物質と視床下部におけるその特異的レセプターとの関係を明らかにすることは、内分泌異常などに起因する疾患の治療などための医薬品開発において非常に重要な手段であるといえる。

発明の開示

本発明は、脳（特に、視床や視床下部など）に発現する新規なGタンパク質共役型レセプタータンパク質を提供することを課題とする。さらに、本発明は、該レセプタータンパク質を利用したリガンドおよび医薬品の候補化合物のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

本発明者らは、上記課題を解決するために、まず、既知のGタンパク質共役型レセプタータンパク質において高度に保存されている領域を独自に抽出し、これに対応するプライマーを設計してラット視床及び視床下部由来のmRNAに対し逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）を行った。次いで、これにより増幅された多くのクローンの中から無作為にクローンを選択し、その部分的な塩基配列の決定を行った。そして、塩基配列の決定を行ったクローンの中から公知のクローンを消去するために、類似性検索により公知のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードすると判断されたクローンのcDNAをプローブとして、コロニーハイブリダイゼーションを行ない、いずれのプローブにもハイブリダイズしない陰性クロー

ーンを選択した。そして、この陰性クローンの塩基配列に基づきプローブを調製し、ラット視床及び視床下部由来のcDNAライブラリーのスクリーニングを行うことにより、ラットGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードする全長cDNAを単離することに成功した。また、本発明者等は、得られたラットcDNAに対応するヒト全長cDNAを単離することにも成功した。また、本発明者らは、これら遺伝子の発現の組織特異性をノーザンブロット解析した結果、これら遺伝子が脳に特異的に発現することを見出した。

これらGタンパク質共役型レセプタータンパク質は、医薬品としての利用が期待されるレセプターからのシグナル伝達を調節する化合物やリガンドのスクリーニングにおいて非常に有用であると考えられる。

従って、本発明は、脳に発現する新規なGタンパク質共役型のレセプタータンパク質、これらタンパク質をコードするDNA、およびこれらタンパク質を利用したりリガンドおよび医薬品候補化合物のスクリーニング方法に関する。

より具体的には、

- (1) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列または該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加したアミノ酸配列を有する、グアノシン三リン酸結合タンパク質共役型のレセプタータンパク質、
- (2) 配列番号：20に記載のアミノ酸配列または該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加したアミノ酸配列を有する、グアノシン三リン酸結合タンパク質共役型のレセプタータンパク質、
- (3) 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、グアノシン三リン酸結合タンパク質共役型のレセプタータンパク質、
- (4) 配列番号：21に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、グアノシン三リン酸結合タンパク質共役型のレセプタータンパク質、

- (5) (1) から (4) のいずれかに記載のレセプタータンパク質の部分ペプチド、
- (6) (1) から (4) のいずれかに記載のレセプタータンパク質または (5) に記載の部分ペプチドをコードする DNA、
- (7) 配列番号：2 または 21 に記載の塩基配列を有する (6) に記載の DNA、
- (8) (5) 乃至 (7) のいずれかに記載の DNA を含有することを特徴とするベクター、
- (9) (8) に記載のベクターを保持する形質転換体、
- (10) (9) 記載の形質転換体を培養する工程を含む、(1) から (4) のいずれかに記載のレセプタータンパク質または (5) に記載の部分ペプチドの製造方法、
- (11) (1) から (4) のいずれかに記載のレセプタータンパク質または (5) に記載の部分ペプチドに被検化合物を接触させ、該タンパク質または部分ペプチドに結合する化合物を選択する工程を含む、(1) から (4) のいずれかに記載のレセプタータンパク質に結合するリガンドのスクリーニング方法、
- (12) (1) から (4) のいずれかに記載のレセプタータンパク質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、
- (a) 被検化合物の存在下で (1) から (4) のいずれかに記載のレセプタータンパク質または (5) に記載の部分ペプチドにリガンドを接触させ、該タンパク質もしくはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性を検出する工程、
- (b) 工程 (a) で検出された結合活性を、被検化合物非存在下での結合活性と比較し、該タンパク質または部分ペプチドとリガンドとの結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、
- (13) (1) から (4) のいずれかに記載のレセプタータンパク質または (5) に記載の部分ペプチドを含有することを特徴とする、(1) から (4) のいずれかに記載のレセプタータンパク質とそのリガンドとの結合を阻害する化合

物のスクリーニング用キット、

(14) (1) から (4) のいずれかに記載のレセプタータンパク質に結合する抗体、に関する。

なお、本発明において「Gタンパク質共役型のレセプタータンパク質」とは、Gタンパク質の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行なっているレセプタータンパク質を指す。また、本発明において「リガンド」とは、Gタンパク質共役型のレセプタータンパク質に結合して、シグナル伝達を誘導する能力を有する天然の化合物を指す。また、本発明において「アゴニスト」とは、Gタンパク質共役型のレセプタータンパク質のリガンドと同様の生理活性を有する化合物を指し、天然の化合物および人工的に合成された化合物の双方が含まれる。また、本発明において「アンタゴニスト」とは、Gタンパク質共役型のレセプタータンパク質のリガンドの生理活性を抑制する能力を有する化合物を指し、天然の化合物および人工的に合成された化合物の双方が含まれる。また、本発明における「タンパク質」および「ペプチド」にはその塩も含まれる。

本発明は、新規なGタンパク質共役型レセプタータンパク質に関する。本発明等により単離されたラット由来のGタンパク質共役型レセプタータンパク質「BG2」のcDNAの塩基配列を配列番号：2に、「BG2」タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：1に示す。また、本発明等により単離されたヒト由来のGタンパク質共役型レセプタータンパク質「BG2」のcDNAの塩基配列を配列番号：21に、「BG2」タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：20に示す。

ラット「BG2」タンパク質は、公知のGタンパク質共役型レセプタータンパク質であるウシ由来ムスカリン性アセチルコリンレセプターM3タンパク質 (Lee, P. H. et al., Biochim. Biophys. Acta 1223, 151-154 (1994))、ヒト由来ムスカリン性アセチルコリンレセプターM5タンパク質 (Bonner, T. I. et al., Neuron 1, 403-410 (1988))、マウス由来 α 2Aアドレノセプター (Link, R. et al., Mol. Pharmacol. 42, 16-27 (1992)) とそれぞれ26 %、25 %、29 %のホモロジーを

有する。また、疎水性プロット解析の結果、ラット「BG2」タンパク質は、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質に特徴的な疎水性ドメイン（7つの膜貫通領域）を保持していた。さらに、ラット「BG2」cDNAのコード領域のサイズも、公知のGタンパク質共役型レセプタータンパク質と同程度の約1.2kbを示した。

一方、ヒト「BG2」タンパク質は、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であるヒト由来 α -2C-1アドレノセプター (Regan, J. W. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85, 6301-6305(1988))、マウス由来 β -1アドレノセプター (Jasper J. R. et al., Biochem. Biophys. Acta 1178, 307-309(1993))、ヒト由来ムスカリン性アセチルコリンレセプターM3 (Peralta, E. G. et al., EMBO J. 6, 3923-3929(1987)) とそれぞれ32 %、28 %、27%のホモロジーを有する。

これらの事実は、これら「BG2」タンパク質が、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質ファミリーに属することを示している。そして、「BG2」タンパク質がGタンパク質共役型レセプタータンパク質であることは、そのリガンドの作用によりG蛋白質の活性化を通じてシグナル伝達を行っていることを示している。

また、ノーザンブロット解析により、これら「BG2」蛋白質をコードする遺伝子が脳特異的に発現することが示された。また、In situハイブリダイゼーションにおいて、ラット「BG2」遺伝子は、海馬および脊髄で強い発現が認められ、視床下部、視床および小脳においても発現が検出された。

海馬は記憶や学習に重要な役割を担い、小脳は体性運動の制御を行い、視床下部は自律神経系の中樞である。「BG2」蛋白質はこれら機能の調節に関与していると考えられる。従って、「BG2」蛋白質やその遺伝子、「BG2」蛋白質の機能を調節し得るアゴニストやアンタゴニストは、記憶・学習障害の改善や、血圧、消化、体温、摂食等の自律神経系の調節への応用が考えられる。

「BG2」タンパク質は、天然のタンパク質の他、遺伝子組み換え技術を利用した組換えタンパク質として調製することができる。天然のタンパク質は、例えば、「BG2」タンパク質が発現していると考えられる視床または視床下部などの組織の

抽出液に対し、後述する「BG2」抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行う方法により調製することが可能である。一方、組換えタンパク質は、後述するように「BG2」タンパク質をコードするDNAで形質転換した細胞を培養することにより調製することが可能である。

また、当業者であれば、公知の方法を用いて天然型のラットやヒト「BG2」タンパク質（それぞれ配列番号：1、配列番号：20）中のアミノ酸の置換などの修飾を行い、天然型のタンパク質と同等の機能（グアノシン三リン酸結合タンパク質の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行なう機能）を有する改変タンパク質を調製することが可能である。また、タンパク質のアミノ酸の変異は天然においても生じうる。このようにアミノ酸の置換、欠失、付加などにより天然型のタンパク質に対してアミノ酸配列が変異した変異体であって、天然型のタンパク質と同等の機能を有するタンパク質も本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に含まれる。当業者に公知のアミノ酸を改変する方法としては、例えば、Kunkel法（Kunkel, T. A. et al., *Methods Enzymol.* 154, 367-382 (1987)）、ダブルプライマー法（Zoller, M. J. and Smith, M., *Methods Enzymol.* 154, 329-350 (1987)）、カセット変異法（Wells, et al., *Gene* 34, 315-23 (1985)）、メガプライマー法（Sarkar, G. and Sommer, S. S., *Biotechniques* 8, 404-407 (1990)）が挙げられる。機能的に同等なタンパク質におけるアミノ酸の変異数は、通常、全アミノ酸の10%以内、好ましくは10アミノ酸以内、さらに好ましくは3アミノ酸以内（例えば、1アミノ酸）である。

また、当業者にとってはハイブリダイゼーション技術（Hanahan, D. and Meselson, M., *Meth. Enzymol.* 100, 333-342 (1983)、Benton, W. D. and Davis, R. W., *Science* 196, 180-182 (1977)）などを用いて、ラットやヒト「BG2」cDNA配列（それぞれ配列番号：2、配列番号：21）またはその一部を基に、種々の他の生物からこれと相同性の高いDNAを単離し、さらに単離したDNAからこれら「BG2」タンパク質と同等の機能を有するタンパク質を得ることも常套手段である。即

ち、当業者であれば、ラットやヒト「BG2」cDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、機能的に同等なタンパク質を調製することが可能であり、これらのタンパク質もまた本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に含まれる。機能的に同等なタンパク質を単離する他の生物としては、例えば、マウス、ウサギ、ヒツジ、ウシ、イヌ、ブタなどが挙げられ、特に脳の組織（例えば、視床や視床下部など）が単離に適している。

ラットやヒト「BG2」タンパク質と同等の機能を有するタンパク質をコードするDNAは、通常、ラットやヒト「BG2」cDNAの塩基配列（配列番号：2、配列番号：21）と高い相同性を有する。高い相同性とは、塩基レベルで少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上の配列の同一性を指す。配列の相同性は、FASTAプログラムを利用して決定することができる。

ラットやヒト「BG2」cDNAと相同性の高いDNAを単離するためのハイブリダイゼーションの条件としては、通常、ハイブリダイゼーションを「6 x SSC、40 % ホルムアミド、25 °C」、洗浄を「1 x SSC、55 °C」で行う。好ましい条件としては、ハイブリダイゼーションを「6 x SSC、40 % ホルムアミド、37 °C」、洗浄を「0.2 x SSC、55 °C」で行う。さらに好ましい条件としては、ハイブリダイゼーションを「6 x SSC、50 % ホルムアミド、37 °C」、洗浄を「0.1 x SSC、62 °C」で行う。なお、当業者であれば、SSCの希釈率、ホルムアミド濃度、温度などの諸条件を適宜選択することで、上記の条件と同様のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件を実現することができる。

また、本発明は、上記本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の部分ペプチドを包含する。本発明の部分ペプチドとしては、例えば、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質のN末端領域の部分ペプチドが挙げられ、該ペプチドは抗体の調製に利用することができる。本発明の部分ポリペプチドは、少なくとも15アミノ酸、好ましくは20アミノ酸の鎖長を有する。

また、本発明は、上記本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質または

その部分ペプチドをコードするDNAに関する。本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質やその部分ペプチドをコードするDNAとしては、これらタンパク質やペプチドをコードしうるものであれば特に制限はなく、cDNA、ゲノムDNA、および合成DNAが含まれる。本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNAは、例えば、配列番号：2や配列番号：21に記載のcDNAあるいはその断片、それらに相補的なRNA、または該cDNAの配列の一部を含む合成オリゴヌクレオチドを ^{32}P などで標識し、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質が発現している組織（例えば、視床、視床下部）由来のcDNAライブラリーにハイブリダイズさせることによりスクリーニングすることができる。あるいは、これらcDNAの塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、適当な組織（例えば、視床、視床下部）由来のcDNAを鋳型にポリメラーゼ連鎖反応により増幅し、クローニングすることもできる。ゲノムDNAは、例えば、配列番号：2や配列番号：21に記載のcDNAあるいはその断片、それらに相補的なRNA、または該cDNAの配列の一部を含む合成オリゴヌクレオチドを ^{32}P などで標識し、ゲノムDNAライブラリーにハイブリダイズさせることによりスクリーニングすることができる。あるいは、これらcDNAの塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、ゲノムDNAを鋳型にポリメラーゼ連鎖反応により増幅し、クローニングすることもできる。一方、合成DNAは、例えば、配列番号：2や配列番号：21に記載のcDNAの部分配列を持つオリゴヌクレオチドを化学合成し、アニーリングさせて二本鎖にし、DNAリガーゼで結合させることにより調製することができる（Khorana, H. G. et al., J. Biol. Chem. 251, 565-570 (1976); Goeddel D. V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 106-110 (1979))。

これらDNAは、組換えタンパク質の生産に有用である。即ち、上記本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするDNA（例えば、配列番号：2や配列番号：21に記載のDNA）を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入して得た形質転換体を培養し、発現させたタンパク質を精製するこ

とにより本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を組換えタンパク質として調製することが可能である。本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質はレセプタータンパク質であるため、細胞膜に発現させて調製することが可能である。

具体的には、宿主が大腸菌エシェリシア・コリ (*Escherichia coli*) の場合、プラスミドベクターpET-3 (Rosenberg, A. H. et al., Gene 56, 125-35 (1987))、pGEX-1 (Smith, D. B. and Johnson, K. S., Gene 67, 31-40 (1988)) などが用いられる。大腸菌の形質転換は、Hanahan法 (Hanahan, D., J. Mol. Biol. 166, 557-580 (1983))、電気穿孔法 (Dower, W. J. et al., Nucl. Acids Res. 16, 6127-6145 (1988)) などで行う。宿主が分裂酵母シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) の場合には、プラスミドベクターpESP-1 (Lu, Q. et al., Gene 200, 135-144 (1997)) などが用いられる。酵母の形質転換は、例えば、スフェロプラスト法 (Beach, D. and Nurse, P., Nature 290, 140 (1981))、酢酸リチウム法 (Okazaki, K. et al., Nucleic Acids Res. 18, 6485-6489 (1990)) などにより行なわれる。

一方、宿主がほ乳動物細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞CHO、ヒトHeLa細胞などの場合、pMSG (クロンテク社) などのベクターが用いられる。ほ乳動物細胞への組換えDNAの導入は、リン酸カルシウム法 (Graham, F. L. and van der Eb, A. J., Virology 52, 456-467 (1973))、DEAE-デキストラン法 (Sussman, D. J. and Milman, G., Mol. Cell. Biol. 4, 1641-1643 (1984))、リポフェクション法 (Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 84, 7413-7417 (1987))、電気穿孔法 (Neumann, E. et al., EMBO J. 1, 841-845 (1982)) などで行われる。宿主が昆虫細胞の場合には、バキュロウイルスベクターpBacPAK8/9 (クロンテク社) などが用いられる。昆虫細胞の形質転換は、例えば、バイオテクノロジー (Bio/Technology) ,6, 47-55(1980)) などに記載の方法に従って行なうことができる。

宿主細胞において発現させた組換えタンパク質は、公知の方法により精製することができる。また、例えば、N末端にヒスチジン残基のタグ、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) などを結合した融合タンパク質の形で合成し、金属キレート樹脂、GST親和性レジンに結合させることにより精製することができる (Smith, M. C. et al., J. Biol. Chem. 263, 7211-7215 (1988))。例えば、ベクターとしてpESP-1を用いた場合、目的のタンパク質は、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として合成されるため、GST親和性レジンに結合させることより組換えタンパク質を精製できる。融合タンパク質から目的タンパク質を分離するには、例えば、トロンビン、血液凝固因子Xaなどで切断する。

本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするDNAは、また、その変異に起因する疾患の遺伝子治療に応用することも可能である。遺伝子治療に用いる場合には、ヒト細胞への遺伝子導入には、レトロウイルスベクター (Danos, O. and Mulligan, R. C., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 85, 6460-6464 (1988); Dranoff, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 90, 3539-3543 (1993))、アデノウイルスベクター (Wickham, T. J. et al., Cell 73, 309-319 (1993)) などを用いる方法が用いられている。患者への投与方法としては、骨髓移植、皮下注射、静脈注射などが用いられる (Asano, S., 蛋白質核酸酵素, 40, 2491-2495 (1995))。

また、本発明は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に結合する抗体に関する。本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に結合する抗体は、当業者に公知の方法 (例えば、「新生化学実験講座1, タンパク質I, 389-406, 東京化学同人」参照) により調製することが可能である。ポリクローナル抗体の調製は、例えば、以下の如く行う。ウサギ、モルモット、マウス、ニワトリなどの免疫動物に適量の上記タンパク質またはペプチドを投与する。投与は、抗体産生を促進するアジュバント (FIAやFCA) と共に行ってもよい。投与は、通常、数週間ごとに行う。免疫を複数回行うことにより、抗体価を上昇させることがで

きる。最終免疫後、免疫動物から採血を行うことにより抗血清が得られる。この抗血清に対し、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテインAや固定化抗原を用いたアフィニティー精製を行うことにより、ポリクローナル抗体を調製することができる。一方、モノクローナル抗体の調製は、例えば、以下の如く行う。本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドを、上記と同様に免疫動物に免疫し、最終免疫後、この免疫動物から脾臓またはリンパ節を採取する。この脾臓またはリンパ節に含まれる抗体産生細胞とミエローマ細胞とをポリエチレングリコールなどを用いて融合し、ハイブリドーマを調製する。目的のハイブリドーマをスクリーニングし、これを培養し、その培養上清からモノクローナル抗体を調製することができる。モノクローナル抗体の精製は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテインAや固定化抗原を用いたアフィニティー精製により行うことができる。これにより調製された抗体は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質のアフィニティー精製のために用いられる他、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現異常に起因する疾患の検査や抗体治療、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現量の検出などに利用することが可能である。

抗体治療に用いる場合、ヒト型抗体もしくはヒト抗体であることが好ましい。ヒト型抗体は、例えば、マウスーヒトキメラ抗体であれば、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に対する抗体を産生するマウス細胞から抗体遺伝子を単離し、そのH鎖定常部をヒトIgE H鎖定常部遺伝子に組換え、マウス骨髓腫細胞J558Lに導入することにより調製できる (Neuberger, M. S. et al., Nature 314, 268-270 (1985))。また、ヒト抗体は、免疫系をヒトと入れ換えたマウスに本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を免疫することにより調製することが可能である。

また、本発明は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に対するリ

ガンドのスクリーニング方法に関する。このスクリーニング方法においては、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドに被検化合物を接触させ、これらタンパク質もしくはペプチドに結合する化合物を選択する工程を含む。被検化合物としては、例えば、アセチルコリン、アデノシン、アドレナリン、ノルアドレナリン、アンジオテンシン、ボムベシン、ブラジキニン、C5aアナフィラトキシン、カルシトニン、カナビノイド、ケモカイン、コレシストキニン、ドーパミン、エンドセリン、フォルミルメチオニルペプチド、GABA、ガラニン、グルカゴン、グルタミン酸、グリコペプチドホルモン、ヒスタミン、5-ヒドロキシトリプトファン、ロイコトリエン、メラノコルチン、神経ペプチドY、ニューロテンシン、オドラント、オピオイドペプチド、オプシン、パラサイロイドホルモン、血小板活性化因子、プロスタノイド、ソマトスタチン、タキキニン、トロンビン、サイロトロビン放出ホルモン、バソプレシン、オキシトシン (Watson, S. and Arkininstall, S., The G-Protein Linked Receptor FactsBook, Academic Press (1994)) などの公知の化合物、その他の精製タンパク質、遺伝子 (ライブラリーも含む) の発現産物、リガンドが存在していることが予想される組織もしくは細胞 (例えば、脳、視床、視床下部) の抽出液、細胞培養上清などが用いられる。スクリーニングに用いる本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質は、例えば、所望の細胞 (該タンパク質を発現するように処理した形質転換体を含む) 内または細胞表面に発現した形態、該細胞の細胞膜画分としての形態、アフィニティーカラムに結合した形態であってもよい。スクリーニングに用いる被検化合物は、必要に応じて適宜標識して用いられる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識などが挙げられるが、これらに制限されない。本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質と被検化合物との結合は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に結合した化合物に付された標識による検出 (例えば、結合量を放射活性や蛍光強度により検出する) のほか、被検化合物の細胞表面上の本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質への結合による細胞内へのシグナル伝達 (例えば、Gタン

パク質の活性化、 Ca^{2+} またはcAMPの濃度変化、ホスホリパーゼCの活性化、pHの変化)を指標に検出することもできる。具体的な方法については、例えば、文献 (Cell Calcium 14,663-671(1993)、Analytical Biochemistry 226,349-354(1995)、J.Biol.Chem.268,5957-5964(1993)、Cell 92,573-585(1998)、Nature 393,272-273(1998)) や公報 (特開平9-268号公報) の記載に準じて行うことができる。その他、TWOハイブリッドシステム (Zervos et al.,Cell 72,223-232(1994)、Fritz et al.,Nature 376,530-533(1995)) を利用したレポーター遺伝子の活性の検出によっても結合を検出することができる。

また、本発明は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法に関する。このスクリーニング方法は、(a) 被検化合物の存在下で本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドにリガンドを接触させ、該タンパク質もしくはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性を検出する工程、および (b) 工程 (a) で検出された結合活性を、被検化合物非存在下での結合活性と比較し、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性を低下させる化合物を選択する工程を含む。被検化合物としては、タンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、人工的に合成された化合物、組織や細胞の抽出液、血清などが挙げられるが、これらに制限されない。スクリーニングに用いる本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質は、例えば、所望の細胞 (該タンパク質を発現するように処理した形質転換体を含む) 内または細胞表面に発現した形態、該細胞の細胞膜画分としての形態、アフィニティーカラムに結合した形態であってもよい。スクリーニングに利用するリガンドは必要に応じて適宜標識して用いられる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識などが挙げられるが、これらに制限されない。本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプ

チドに結合したリガンドに付された標識による検出（例えば、結合量を放射活性や蛍光強度により検出する）のほか、被検化合物の細胞表面上の本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質への結合による細胞内へのシグナル伝達（例えば、Gタンパク質の活性化、 Ca^{2+} またはcAMPの濃度変化、ホスホリパーゼCの活性化、pHの変化）を指標に検出することもできる。具体的な方法については、例えば、文献（Cell Calcium 14,663-671(1993)、Analytical Biochemistry 226,349-354(1995)、J.Biol.Chem.268,5957-5964(1993)、Cell 92,573-585(1998)、Nature 393,272-273(1998)）や公報（特開平9-268号公報）の記載に準じて行うことができる。検出の結果、被検化合物の存在下における結合活性が、被検化合物の非存在下における結合活性（対照）より低い値を示した場合には、該被検化合物は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドとリガンドとの結合を阻害する活性を有すると判定される。このような化合物は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に結合して細胞内へのシグナル伝達を誘導する活性を有する化合物（アゴニスト）および該活性を有しない化合物（アンタゴニスト）などが含まれる。アゴニストは、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に対するリガンドと同様の生理活性を有しており、一方、アンタゴニストは、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に対するリガンドが有する生理活性を抑制する。このため、これらアゴニストやアンタゴニストは、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を介したシグナル伝達系の異常などに起因する疾患の治療などのための医薬組成物として有用である。

また、本発明は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドを含有することを特徴とする、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質とそのリガンドとの結合を阻害する化合物のスクリーニング用キットに関する。本発明のキットにおける本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドは、例えば、所望の細胞（該タンパク質を発現するように処理した形質転換体を含む）内または細胞表面に発現した形態、該

細胞の細胞膜画分としての形態、アフィニティーカラムに結合した形態であってもよい。本発明のキットの他の要素としては、上記レセプタータンパク質標品以外に、例えば、リガンド標品（標識されたもの、および標識されていないもの）、リガンドとレセプタータンパク質の反応のための緩衝液、洗浄液などが含まれていてもよい。リガンドに付される標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識などが挙げられる。本発明のキットの利用は、例えば、公報（特開平9-268号公報）の記載に準じて行うことができる。

図面の簡単な説明

図1は、マウス「BG2」タンパク質の疎水性プロットを示す。図中の1乃至7の番号はGタンパク質共役型レセプタータンパク質の特徴的な7つの疎水性領域（膜貫通領域）を示す。また、図下の番号は「BG2」タンパク質のアミノ酸の番号を示す。

図2は、ヒトおよびマウス「BG2」遺伝子の発現の組織特異性をノーザンブロット解析した結果を示す。

図3は、脳におけるマウス「BG2」遺伝子の発現の局在をIn situハイブリダイゼーションにより解析した結果を示す。

図4は、脊髄におけるマウス「BG2」遺伝子の発現の局在をIn situハイブリダイゼーションにより解析した結果を示す。「センス」はセンスRNAプローブ（mRNAとハイブリダイズしない；ネガティブコントロール）を用いてハイブリダイゼーションを行った結果、「アンチセンス」はアンチセンスRNAプローブ（mRNAとハイブリダイズする）を用いてハイブリダイゼーションを行った結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

[実施例1] ラットGタンパク質共役型受容体遺伝子の単離

Gタンパク質共役型受容体は、細胞膜を7回貫通するという構造上の特徴を有し、膜貫通領域およびその近傍のアミノ酸配列はしばしばよく保存されている。本発明者らは、まず、既知のGタンパク質共役型受容体であるマウス神経ペプチドY受容体Y1(GenBank Accession Number Z18280)、ラットY1(同Z11504)、ヒトY1(同M84755)、マウス神経ペプチドY受容体Y4(同U40189)、ラットY4(同Z68180)、ヒトY4(同Z66526)、マウス神経ペプチドY受容体Y6(同U58367)において高度に保存されている第2膜貫通領域および第7膜貫通領域のDNA配列の比較から、それぞれ配列番号:3で表される新規センスプライマー、配列番号:4で表される新規アンチセンスプライマーを合成した。

次いで、ラット(*Rattus norvegicus*)視床および視床下部由来ポリ(A)⁺RNAから、RNA-PCRキット(宝酒造社)を用いて一本鎖cDNAを合成し、これら2本のプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)をおこなった。具体的には、ラット視床および視床下部から、ファストトラック2.0キット(インビトロジェン社)を用いてポリ(A)⁺RNAを精製した。RNA-PCRキット(宝酒造社)のプロトコルにしたがって、精製したポリ(A)⁺RNA 75ngから相補鎖DNAを合成した。cDNA全量を用いて、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による増幅をおこなった。反応液の組成は、各0.15mM dNTPs、1.5mM MgCl₂、0.025U/μl rTaqポリメラーゼ(宝酒造社)、各0.5μM ディジェネレートプライマーFg(配列番号:3)およびRb(配列番号:4)、10×酵素付属PCRバッファーで、総反応液量130μlとした後、20μlずつ6本に分注した。ペルティエサーマルサイクラーPTC200(MJリサーチ社)で、94°C2分、「94°C30秒、48°C1分、72°C1分30秒」を35サイクル、72°C8分の条件でPCRをおこなった。PCR反応後、6本の反応液を1本に集め、ウィザードPCR精製キット(プロメガ社)を用いて増幅産物を精製し、30μlのTEで溶出した。このうち2μlを、TOPO TAクローニングキット(インビトロジェン社)のpCR2.1ベクターにクローニングした。宿主にはXL1-Blueを用い、E.coliバルサー(バイオラッド社)で形質転換した。

得られた形質転換体のうち、白色または薄青色のコロニーを、遺伝子ライブラリー作製装置バイオピック（バイオリボティックス社）を用いて、5,760個を無作為に選択し、384ウェルプレート15枚に分注した、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン入りLB培地に植菌した。クローンを37°Cで一晩培養し、遺伝子ライブラリー複製装置バイオグリッド（バイオリボティックス社）を用いて、グリセロールストック用に100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン、25%グリセロール入りLB寒天培地に載せたフィルター上、およびコロニーハイブリダイゼーション用に100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン入りLB寒天培地に載せたフィルター上に、それぞれ1枚ずつレプリカを作成した。

得られたPCRクローンの中には、NPY受容体cDNAが多数重複して存在すると予想されたため、得られた5,760クローンから80クローンを無作為に選び、部分塩基配列を決定した。塩基配列決定のための鋳型にはプラスミド自動単離装置PI100 Σ （倉敷紡績社）で精製したプラスミドDNAを、酵素反応にはダイプライマーサイクルシーケンシングキットFS（パーキンエルマー社）を、反応産物の電気泳動にはDNAシーケンサー377（パーキンエルマー社）を用いた。ウィスコンシン・パッケージ（ジェネティック・コンピュータ・グループ社）のblastプログラムで、得られた配列を類似性検索にかけた結果、80個のうち29個はコイルドコイル様タンパク質1（GenBank Accession Number U79024）の、17個は神経ペプチドY受容体Y1同Z11504）のcDNAであった。そこで、これら2種類のcDNA断片をプローブに用いて、それぞれディジェネレートPCR増幅断片ライブラリーフィルターにハイブリダイズした。プローブは、それぞれのクローンの挿入断片をPCRで増幅し、ウィザードPCR精製キット（プロメガ社）で精製し、プライム-イットIIランダムプライマーラベリングキット（ストラタジーン社）を用いて、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTPで標識したものをを用いた。コロニーハイブリダイゼーションは常法にしたがって行った（Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory manual 2nd edn., (1989)）。コイルドコイル様タンパク質1に対しても神経ペプチドY受容体Y1に対しても陰性のクローンについて部分塩基配列を決定した。塩基配列決定のための鋳型には、

各クローンの培養液からPCRで挿入断片を増幅し、PCR産物精製用キット（アマシヤム社）で精製したDNAを用いた。酵素反応にはダイプライマーサイクルシーケンシングキットFSを、反応産物の電気泳動にはDNAシーケンサー377を用いた。ウィスコンシン・パッケージのblastプログラムで、得られた配列を類似性検索にかけた結果、ムスカリン性アセチルコリン・レセプターM5（GenBank Accession Number M22926）と有意の類似性を示すクローンが見出された。このクローンを工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した。

（イ）寄託機関の名称・あて名

名称：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）

（ロ）寄託日（原寄託日）：平成9年12月25日

（ハ）寄託番号 生命研条寄第6575号（FERM BP-6575）

次いで、この遺伝子の全長cDNAを単離するために、まず、ラット視床および視床下部由来のcDNAライブラリーを構築した。cDNAの合成は、cDNA合成キット（ストラタジーン社）のプロトコルに従い、ベクターにはpEF1x、宿主にはXL1-blue MRF'（ストラタジーン社）を使用した。

なお、pEF1xは、pcDNA3（インビトロジェン社）を以下のように改良したものである。

（1）ヒトEF1 α プロモーター（GenBank Accession number J04617）の調製

ヒトゲノミックDNAから、プライマー（配列番号：6/CGAGGATCCGTGAGGCTCCGGT GCCCGTC、配列番号：7/CGGGTAAGCTTCACGACACCTGAAATGGAAGA）を用いてPCRを行い、BamHI（宝酒造社）およびHindIII（宝酒造社）で消化し、プラスミドベクターpUC19（宝酒造社）にクローニングした。得られたプラスミドDNAをXhoIで消化、クレノウ酵素（宝酒造社）で末端を平滑化した後、DNAライゲーションキット（宝酒

造社)でセルフ・ライゲーションし、クローニングした。得られたプラスミドDNAをBamHIおよびHindIIIで消化し、インサート部分を回収した。

(2)pcDNA3の改変

プラスミドpcDNA3DNAをMluI(宝酒造社)で消化、クレノウ酵素(宝酒造社)で末端を平滑化した後、DNAライゲーションキットでセルフ・ライゲーションし、クローニングした。得られたプラスミドDNAをAflIII(ニューイングランドバイオラボ社)およびSmaI(宝酒造社)で消化、クレノウ酵素(宝酒造社)で末端を平滑化した後、DNAライゲーションキットでセルフ・ライゲーションし、クローニングした。得られたプラスミドDNAをBglII(宝酒造社)およびHindIIIで消化し、CMVプロモーター部分を除いた断片を回収し、DNAライゲーションキットを用いて(1)で回収したインサート断片と連結し、クローニングした。これによりpEF1xを構築した。

次いで、cDNA断片の塩基配列からオリゴヌクレオチドプローブ(配列番号:8/CCTTCTGCATCCCATTGTACGTACC)を合成し、ジーントラッパーcDNAポジティブセレクションシステム(ギブコBRL社)のプロトコルにしたがって、上記のように調製されたラット視床及び視床下部由来のcDNAライブラリーから、複数個のクローンを得た。次に、先に単離したクローン(FERM P-16572)に挿入されたcDNA断片をプローブにしてコロニーハイブリダイゼーションを行い、陽性のクローンを得た。このクローンを工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した。

(イ)寄託機関の名称・あて名

名称:通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名:日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305-8566)

(ロ)寄託日(原寄託日):平成9年12月25日

(ハ)寄託番号 生命研条寄第6574号(FERM BP-6574)

このクローンの挿入断片長は2.7kbpであった。キアプレップミディキット（キアゲン社）でプラスミドDNAを調製し、ショットガン法（Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory manual 2nd edn., (1989)）で全塩基配列を決定した。cDNAの断片化には、密閉式超音波生物材料処理装置バイオラプター（東湘電機社）を用い、断片化したDNAを2%アガロース低融解ゲル電気泳動で分画し、0.6kbp付近の断片を、gene clean spin kit(bio101社）で精製、T4 DNAポリメラーゼ（宝酒造社）で末端を平滑化して、HincII/BAP処理pUC118ベクターにクローニングした。宿主にはXL1-Blueを用い、E.coliパルサー（バイオラッド社）で形質転換した。得られたショットガンクローンを、ダイプライマーサイクルシーケンシングキットFS（パーキンエルマー社）あるいはダイターミネーターサイクルシーケンシングキットFS（パーキンエルマー社）でシーケンシングした。得られた配列を、DNAシーケンシングソフト・シーケンチャー（日立ソフト社）で結合・編集し、全塩基配列をした。全塩基配列は、2700bpで、413アミノ酸からなるタンパク質をコードしていることが明らかになった（配列番号：5）。オープン・リーディング・フレームの5'側に停止コドンが存在するため、このcDNAは、コード領域全長を含むと考えられる（配列番号：2）。この配列をアミノ酸配列に翻訳したところ、第1、第2、第3、第4、第5、第6および第7膜貫通領域が疎水性プロット上で確認された（図1）。

また、オープン・リーディング・フレームのサイズも、公知のGタンパク質共役型レセプタータンパク質と比較して同程度の約1.2kbであった。Gタンパク質共役型レセプタータンパク質はそのアミノ酸配列にある程度の共通性を示し、一つのタンパク質ファミリーを形成している。そこで、単離したcDNAによってコードされるアミノ酸配列を用いてホモロジー検索を行なったところ、公知のGタンパク質共役型レセプタータンパク質であるウシ由来ムスカリン性アセチルコリンレセプターM3タンパク質（Lee, P. H. et al., Biochim. Biophys. Acta 1223, 151-154 (1994)）、ヒト由来ムスカリン性アセチルコリンレセプターM5タンパク質（Bonner,

T. I. et al., Neuron 1, 403-410 (1988))、マウス由来 α 2Aアドレノセプター (Link, R. et al., Mol. Pharmacol. 42, 16-27 (1992)) とそれぞれ26 %、25 %、29 %のホモロジーを有する全く新規なレセプタータンパク質であることが判明した。

〔実施例2〕 ヒトGタンパク質共役型受容体遺伝子の単離

得られたラットの配列をEST検索にかけたところ、ヒトホモログの断片が見出された (ジーンバンクNID: 946030およびNID: 901756)。ヒト胎児脳cDNAを特異的プライマーIF01 (配列番号: 9/CTTCCGCCGGGCCTTCACCAA) およびIR02 (配列番号: 10/ACAGACACGGCGGGGCTCAC) (プローブ1) を用いてPCRにより増幅した。ブランクハイブリダイゼーションの標準的な方法により、プローブ1を用いて 1.2×10^6 のサイズを有するhuman λ EMBL3 SP6/T7 genomic library (クロンテック社) をスクリーニングした。これにより2つの陽性クローンを単離した。得られたファージクローンをSacIで消化し、一つのクローンの3つのバンドをサブクローニングした。これをそれぞれI1 (配列番号: 11)、I3 (配列番号: 12)、およびI5 (配列番号: 13) と命名した。これらの断片の配列を決定し、仮想的な配列をラットのホモログとの比較により検討した。I1およびI3は、それぞれ特異的プライマーYS03 (配列番号: 14/TGAACGCTTCGGGGGCGCTG) およびYS05 (配列番号: 15/GAGATGGCGAGGTTGAGCAGG)、YS12 (配列番号: 16/GGCTCCAAGCCATCGGCGTC) およびYS14 (配列番号: 17/CTCACTCCAGCAGTGCTCC) を用いてPCR増幅し、そのPCR産物をそれぞれプローブ2およびプローブ3と命名した。ヒト視床下部cDNA (1.3×10^6 ファージ) を150mmプレート当たり 5.6×10^6 の濃度でプレートに播いた。得られたサブプールをプライマーYS03およびYS05を用いたPCRによりチェックした。プローブ2を用いて、ゲノムライブラリーのスクリーニングと同様の方法で、一つの陽性サブプールをスクリーニングした。これによりTM5から5' UTRを含む一つのcDNAクローンを得て、cDNAクローン1と命名した。

プライマーYS07 (配列番号: 18/GCCTCCGCACCCAGAACAAC) およびYS10 (配列番号

: 19/TGCGCCTCTGGATGTTTCA) を用いたPCRにより、cDNAクローン1からプローブ4を増幅した。プローブ3およびプローブ4を用いて、ゲノムライブラリーのスクリーニングと同様の方法で、ヒト海馬ライブラリー (3×10^6 pfu) のスクリーニングを行った。いくつかのクローンを得て、その中で最も長いものをcDNAクローン2と命名して、その配列の決定を行った。このクローンはTM2から3' UTRの領域を有していた。cDNAクローン1をSacIIで消化し、ベクターと5' 端領域を含む3.3kbバンドをシュリンプアルカリフォスファターゼで処理した。cDNAクローン2もまたSacIIで消化し、その1.7kbの断片をcDNAクローン1由来の3.3kb断片に結合させた。この結合された断片が挿入されたクローンを工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した。

(イ) 寄託機関の名称・あて名

名称：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）

(ロ) 寄託日（原寄託日）：平成10年12月17日

(ハ) 寄託番号 生命研条寄第6609号 (FERM BP-6609)

決定されたヒト「BG2」cDNAの塩基配列を配列番号：21に、該cDNAがコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：20に示す。

ヒト「BG2」タンパク質は、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であるヒト由来 α -2C-1アドレノセプター (Regan, J. W. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 85, 6301-6305(1988))、マウス由来 β -1アドレノセプター (Jasper J. R. et al., Biochem. Biophys. Acta 1178, 307-309(1993))、ヒト由来ムスカリン性アセチルコリンレセプターM3 (Peralta, E. G. et al., EMBO J. 6, 3923-3929(1987)) とそれぞれ32 %、28 %、27%のホモロジーを有していた。

[実施例3] ノーザンブロット解析

ヒト「BG2」の検出においては、プローブ4を ^{32}P - γ -dCTP (Amersham, Prime It II)

で標識し、cDNAプローブとして用いた。また、プロット膜としては、MTN (Human Multiple Tissue Northern) プロット (クロンテック社) を用いた。ExpressHyb solution (クロンテック社) 中で68°Cで30分のプレハイブリダイゼーション後、68°Cで1時間プローブを膜にハイブリダイズさせた (最終プローブ濃度は 1.5×10^6 cpm/ml)。0.1% SDSを含む2xSSCで42°Cで30分、そのプロットを洗浄し、最終的な洗浄を0.1% SDSを含む0.1xSSCで50°Cで30分を行った。次いで、そのプロットを-80°Cで2.5日間、コダックのオートラジオグラフィックフィルムに暴露した。

一方、マウスBG2の検出においては、プローブの調製は、ラット「BG2」cDNAを鋳型に、センスプライマーMF2 (配列番号: 22/TGCATCCCATTGTACGTNCC) およびアンチセンスプライマーMR1 (配列番号: 24/TGCTCTGGGACACCATCTTC) を用いてPCRで増幅後、増幅産物をアガロース電気泳動で精製し、上記ヒトと同様に標識することにより調製した。

また、プロット膜としては、Rat MTN (Multiple Tissue Northern) プロット (クロンテック社) を用いた。ハイブリダイゼーション緩衝液 (50% ホルムアミド, 4xSSPE, 1% SDS, 0.5% BLOTTO, 100 µg/ml サケ精子DNA) 中で、42°Cにて一晩のハイブリダイゼーションを行った。洗浄は、0.1% SDSを含む0.1xSSCで65°Cで行った。次いで、そのプロットを-80°Cで一晩、コダックのオートラジオグラフィックフィルムに暴露した。

その結果、ヒトおよびラット由来の「BG2」遺伝子の発現は、特に脳において強く検出された (図2)。

[実施例4] In situハイブリダイゼーション

13から18歳の成体雄Sprague-Dawley rats (Charles River Japan社) をエーテルの吸入により麻酔し、ロータリーポンプに接続し、左心室に挿入したカニューレを通じて、冷却した4%パラホルムアルデヒドローリン酸緩衝液 (pH7.2) 中を注入した。灌流後、脳、脳下垂体、および脊髄を取り出し、矢状方向にまたは冠状に切断した。組織標本を4°Cで夜通し、同様の固定剤で固定した。次の過程はRNaseの混入を避け

るため、注意して行った。組織試料を常法にてパラフィンワックスで包埋し、回転ミクロトーム (Model HM 355 ; MICROM Laborgerate GmbH) を用いて6 μ mの厚さのパラフィン切片を作製した。切片はIn situハイブリダイゼーションを実施するまで-20°Cで無湿状態で保存した。

ラットBG2センスおよびアンチセンスRNAプローブの調製のために、センスプライマーMF2 (配列番号 : 22/TGCATCCCATTGTACGTNCC) およびアンチセンスプライマーMR3 (配列番号 : 23/ATCATTAGGAGCGTGANGG) を用いてMP21プラスミドDNAからPCR増幅したcDNA断片をpZErO-2ベクター (インビトロジェン社) にクローニングした。RNAプローブは、DIG RNA Labeling Kit (ベーリンガーマンハイム社) を用いてジギトキシゲニンで標識した。パラフィン切片をキシレンで脱パラフィンし、段階的エタノール系列で洗浄し、蒸留水に移した。ジギトキシゲニンで標識したRNAプローブを含まないIn situハイブリダイゼーション試薬としては、In situ Hybridization Reagents (ISHR, Code No.316-01951; ニッポンジーン社) を用いた。切片は緩衝液 (PBS; ISHR1) を用いて1分間と10分間の2回インキュベートした。切片を37°Cで10分間、プロティナーゼK (ISHR6) で処理した。氷酢酸 (ISHR4) を含むアセチル化緩衝液 (ISHR3) を用いてアセチル化を15分行い、次いで、PBS/グリシン緩衝液 (ISHR2) を用いて室温で20分のクエンチング後、4xSSC (ISHR5) で10分間、2回洗浄し、次いで、PBS緩衝液で10分間洗浄した。50%ホルムアミド/2xSSCを用いて室温で30分のプレハイブリダイゼーション後、ジギトキシゲニンで標識したRNAプローブ (1 μ g/ml) を用いて42°Cで16時間ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション後の洗浄は、ホルムルムアミド/2xSSCを用いて42°Cで10分間を2回行った。それから切片を37°Cで5分間、NET緩衝液 (ISHR9) で洗浄後、RNaseA (ISHR10) /NET緩衝液 (ISHR9) を用いて37°Cで30分間、RNase処理を行った。0.1xSSC緩衝液 (ISHR11) で20分間、2回洗浄後、切片を移し、標識したジギトキシゲニンを、Digoxigenin Detection Kit (ベーリンガーマンハイム社) を用いて検出した。切片を100mM Tris-HCl, 150mM NaClを含む緩衝液 (緩衝液1) で室温で1分間洗

浄し、室温下、ブロッキング試薬（緩衝液2）で30分間インキュベートした。切片は、アルカリフォスファターゼ標識された抗ジゴキシゲニン抗体を用いて室温で60分間インキュベートした。緩衝液1を用いて15分間、緩衝液3を用いて2分間、室温で洗浄後、切片を緩衝液3で希釈したNBT/Xリン酸溶液と室温で12から14時間インキュベートした。緩衝液4で洗浄後、切片はグリセロールまたはパーマウント（Permount）で封入した。

その結果、図3および図4に示すように、BG2 cDNAプローブは、海馬および脊髄で強くハイブリダイズした。ハイブリダイゼーションはまた、視床下部、視床および小脳においても中程度のハイブリダイゼーションシグナルが検出された。

産業上の利用の可能性

本発明により、脳特異的に発現する新規なGタンパク質共役型レセプタータンパク質およびその遺伝子が提供された。これにより該レセプタータンパク質を利用したリガンドや医薬品の候補化合物のスクリーニングが可能となった。これらリガンドや医薬品の候補化合物は、例えば、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を介したシグナル伝達系の異常などに起因する疾患の診断や治療などへの利用が期待される。

請求の範囲

1. 配列番号：1に記載のアミノ酸配列または該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加したアミノ酸配列を有する、グアノシン三リン酸結合タンパク質共役型のレセプタータンパク質。
2. 配列番号：20に記載のアミノ酸配列または該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加したアミノ酸配列を有する、グアノシン三リン酸結合タンパク質共役型のレセプタータンパク質。
3. 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、グアノシン三リン酸結合タンパク質共役型のレセプタータンパク質。
4. 配列番号：21に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、グアノシン三リン酸結合タンパク質共役型のレセプタータンパク質。
5. 請求項1から4のいずれかに記載のレセプタータンパク質の部分ペプチド。
6. 請求項1から4のいずれかに記載のレセプタータンパク質または請求項5に記載の部分ペプチドをコードするDNA。
7. 配列番号：2または21に記載の塩基配列を有する請求項6に記載のDNA。
8. 請求項5乃至7のいずれかに記載のDNAを含有することを特徴とするベクター。
9. 請求項8に記載のベクターを保持する形質転換体。
10. 請求項9記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項1から4のいずれかに記載のレセプタータンパク質または請求項5に記載の部分ペプチドの製造方法。
11. 請求項1から4のいずれかに記載のレセプタータンパク質または請求項5に記載の部分ペプチドに被検化合物を接触させ、該タンパク質または部分ペ

チドに結合する化合物を選択する工程を含む、請求項 1 から 4 のいずれかに記載のレセプタータンパク質に結合するリガンドのスクリーニング方法。

1 2. 請求項 1 から 4 のいずれかに記載のレセプタータンパク質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 被検化合物の存在下で請求項 1 から 4 のいずれかに記載のレセプタータンパク質または請求項 5 に記載の部分ペプチドにリガンドを接触させ、該タンパク質もしくはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性を検出する工程、

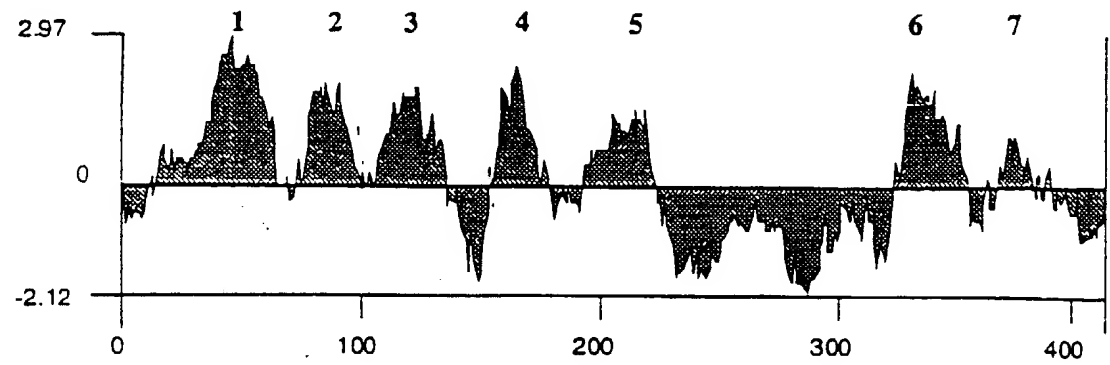
(b) 工程 (a) で検出された結合活性を、被検化合物非存在下での結合活性と比較し、該タンパク質または部分ペプチドとリガンドとの結合活性を低下させる化合物を選択する工程、

を含む方法。

1 3. 請求項 1 から 4 のいずれかに記載のレセプタータンパク質または請求項 5 に記載の部分ペプチドを含有することを特徴とする、請求項 1 から 4 のいずれかに記載のレセプタータンパク質とそのリガンドとの結合を阻害する化合物のスクリーニング用キット。

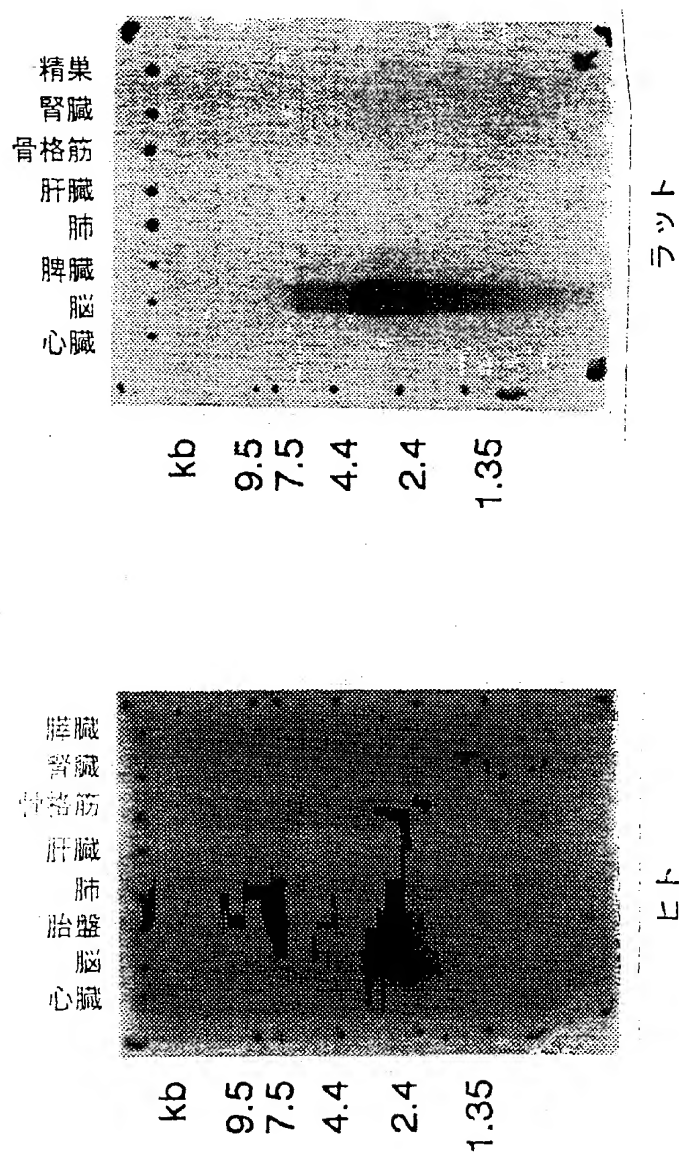
1 4. 請求項 1 から 4 のいずれかに記載のレセプタータンパク質に結合する抗体。

☒ 1



2 / 4

図 2



3/4

図 3

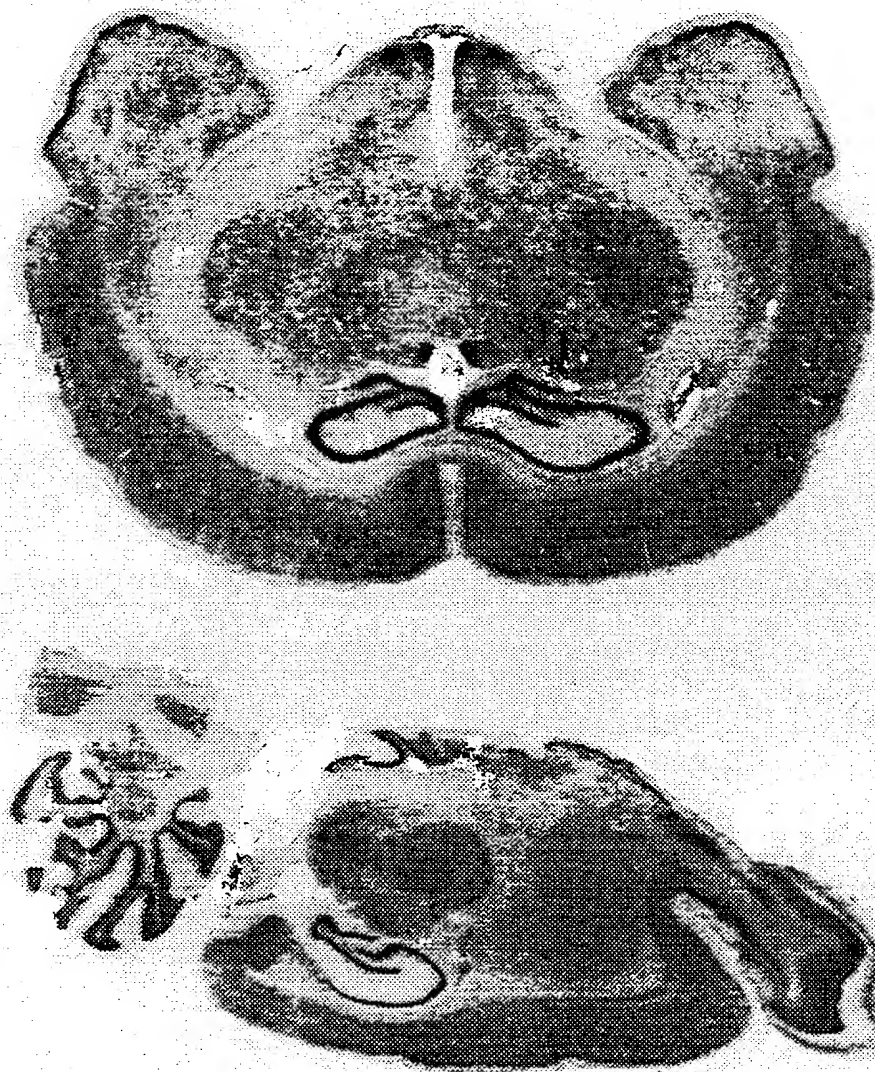
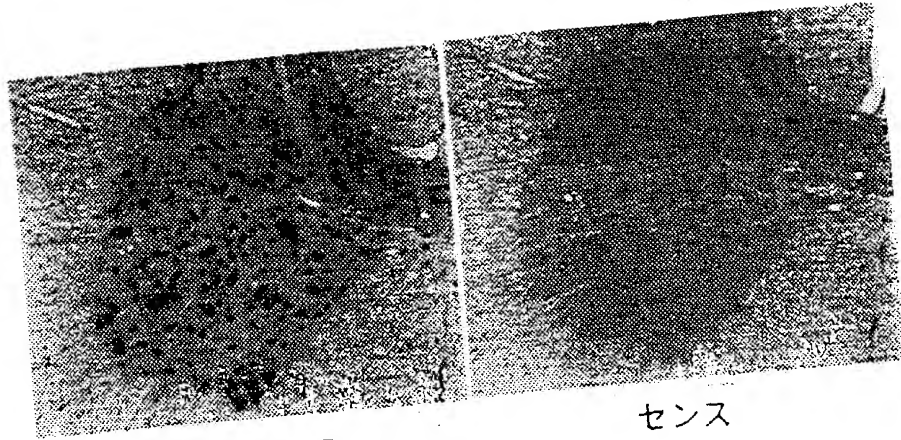


図 4



アンチセンス

センス

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> BANYU PHARMACEUTICAL CO., LTD.

萬有製薬株式会社

<120> G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS

新規なグアノシン三リン酸 (GTP) 結合タンパク質共役型のレセプター
タンパク質

<130> B1-902PCT

<140>

<141>

<150> JP 1997-361187

<151> 1997-12-26

<160> 24

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 413

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 1

Met Glu Arg Ala Pro Pro Asp Gly Leu Met Asn Ala Ser Gly Thr Leu

1 5 10 15

Ala Gly Glu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Arg Gly Phe Ser Ala Ala

20 25 30

Trp Thr Ala Val Leu Ala Ala Leu Met Ala Leu Leu Ile Val Ala Thr

35 40 45

Val Leu Gly Asn Ala Leu Val Met Leu Ala Phe Val Ala Asp Ser Ser

50 55 60

Leu Arg Thr Gln Asn Asn Phe Phe Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp

65 70 75 80

Phe Leu Val Gly Ala Phe Cys Ile Pro Leu Tyr Val Pro Tyr Val Leu

85 90 95

Thr Gly Arg Trp Thr Phe Gly Arg Gly Leu Cys Lys Leu Trp Leu Val

100 105 110

Val Asp Tyr Leu Leu Cys Ala Ser Ser Val Phe Asn Ile Val Leu Ile

115 120 125

Ser Tyr Asp Arg Phe Leu Ser Val Thr Arg Ala Val Ser Tyr Arg Ala

130

135

140

Gln Gln Gly Asp Thr Arg Arg Ala Val Arg Lys Met Ala Leu Val Trp

145

150

155

160

Val Leu Ala Phe Leu Leu Tyr Gly Pro Ala Ile Leu Ser Trp Glu Tyr

165

170

175

Leu Ser Gly Gly Ser Ser Ile Pro Glu Gly His Cys Tyr Ala Glu Phe

180

185

190

Phe Tyr Asn Trp Tyr Phe Leu Ile Thr Ala Ser Thr Leu Glu Phe Phe

195

200

205

Thr Pro Phe Leu Ser Val Thr Phe Phe Asn Leu Ser Ile Tyr Leu Asn

210

215

220

Ile Gln Arg Arg Thr Arg Leu Arg Leu Asp Gly Gly Arg Glu Ala Gly

225

230

235

240

Pro Glu Pro Pro Pro Asp Ala Gln Pro Ser Pro Pro Pro Ala Pro Pro

245

250

255

Ser Cys Trp Gly Cys Trp Pro Lys Gly His Gly Glu Ala Met Pro Leu

260	265	270
His Ser Ser Gly Ser Ser Ser Arg Gly Thr Glu Arg Pro Arg Ser Leu		
275	280	285
Lys Arg Gly Ser Lys Pro Ser Ala Ser Ser Ala Ser Leu Glu Lys Arg		
290	295	300
Met Lys Met Val Ser Gln Ser Ile Thr Gln Arg Phe Arg Leu Ser Arg		
305	310	315 320
Asp Lys Lys Val Ala Lys Ser Leu Ala Ile Ile Val Ser Ile Phe Gly		
325	330	335
Leu Cys Trp Ala Pro Tyr Thr Leu Leu Met Ile Ile Arg Ala Ala Cys		
340	345	350
His Gly Arg Cys Ile Pro Asp Tyr Trp Tyr Glu Thr Ser Phe Trp Leu		
355	360	365
Leu Trp Ala Asn Ser Ala Val Asn Pro Val Leu Tyr Pro Leu Cys His		
370	375	380
Tyr Ser Phe Arg Arg Ala Phe Thr Lys Leu Leu Cys Pro Gln Lys Leu		
385	390	395 400

Lys Val Gln Pro His Gly Ser Leu Glu Gln Cys Trp Lys

405

410

<210> 2

<211> 1239

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1239)

<400> 2

atg gag cgc gcg ccg ccc gac ggg ctg atg aac gcg tcg ggc act ctg 48

Met Glu Arg Ala Pro Pro Asp Gly Leu Met Asn Ala Ser Gly Thr Leu

1 5 10 15

gcc gga gag gcg gcg gct gca ggc ggg gcg cgc ggc ttc tcg gct gcc 96

Ala Gly Glu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Arg Gly Phe Ser Ala Ala

20 25 30

tgg acc gct gtc ctg gct gcg ctc atg gcg ctg ctc atc gtg gcc aca 144

Trp Thr Ala Val Leu Ala Ala Leu Met Ala Leu Leu Ile Val Ala Thr

35 40 45

gta ctg ggc aac gcg ctg gtc atg ctc gcc ttc gtg gcg gat tcg agc 192

Val Leu Gly Asn Ala Leu Val Met Leu Ala Phe Val Ala Asp Ser Ser

50

55

60

ctc cgc acc cag aac aac ttc ttt ctg ctc aac ctc gcc atc tcc gac 240

Leu Arg Thr Gln Asn Asn Phe Phe Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp

65

70

75

80

ttc ctc gtg ggt gcc ttc tgc atc cca ttg tac gta ccc tat gtg ctg 288

Phe Leu Val Gly Ala Phe Cys Ile Pro Leu Tyr Val Pro Tyr Val Leu

85

90

95

acc ggc cgt tgg acc ttc ggc cgg ggc ctc tgc aag ctg tgg ctg gtg 336

Thr Gly Arg Trp Thr Phe Gly Arg Gly Leu Cys Lys Leu Trp Leu Val

100

105

110

gta gac tac cta ctg tgt gcc tcc tcg gtc ttc aac atc gta ctc atc 384

Val Asp Tyr Leu Leu Cys Ala Ser Ser Val Phe Asn Ile Val Leu Ile

115

120

125

agc tat gac cga ttc ctg tca gtc act cga gct gtc tcc tac agg gcc 432

Ser Tyr Asp Arg Phe Leu Ser Val Thr Arg Ala Val Ser Tyr Arg Ala

130

135

140

cag cag ggg gac acg aga cgg gcc gtt cgg aag atg gca ctg gtg tgg 480

Gln Gln Gly Asp Thr Arg Arg Ala Val Arg Lys Met Ala Leu Val Trp

145	150	155	160	
gtg ctg gcc ttc ctg ctg tat ggg cct gcc atc ctg agt tgg gag tac				528
Val Leu Ala Phe Leu Leu Tyr Gly Pro Ala Ile Leu Ser Trp Glu Tyr				
	165	170	175	
ctg tct ggt ggc agt tcc atc ccc gag ggc cac tgc tat gct gag ttc				576
Leu Ser Gly Gly Ser Ser Ile Pro Glu Gly His Cys Tyr Ala Glu Phe				
	180	185	190	
ttc tac aac tgg tac ttt ctc atc acg gcc tcc acc ctc gag ttc ttc				624
Phe Tyr Asn Trp Tyr Phe Leu Ile Thr Ala Ser Thr Leu Glu Phe Phe				
	195	200	205	
acg ccc ttc ctc agc gtt acc ttc ttc aac ctc agc atc tac ctg aac				672
Thr Pro Phe Leu Ser Val Thr Phe Phe Asn Leu Ser Ile Tyr Leu Asn				
	210	215	220	
atc cag agg cgc acc cgc ctt cgg ctt gat ggg ggc cgt gag gct ggc				720
Ile Gln Arg Arg Thr Arg Leu Arg Leu Asp Gly Gly Arg Glu Ala Gly				
225	230	235	240	
cca gaa ccc cca cca gat gcc cag ccc tcg cca cct cca gct ccc ccc				768
Pro Glu Pro Pro Pro Asp Ala Gln Pro Ser Pro Pro Pro Ala Pro Pro				
	245	250	255	

agc tgc tgg ggc tgc tgg cca aaa ggg cat ggc gag gcc atg ccg ttg 816

Ser Cys Trp Gly Cys Trp Pro Lys Gly His Gly Glu Ala Met Pro Leu

260

265

270

cac agc tct ggc agc tcc tca agg ggc act gag agg cca cgc tca ctc 864

His Ser Ser Gly Ser Ser Ser Arg Gly Thr Glu Arg Pro Arg Ser Leu

275

280

285

aaa agg ggc tcc aag cca tca gca tct tca gca tcc ctg gag aag cgc 912

Lys Arg Gly Ser Lys Pro Ser Ala Ser Ser Ala Ser Leu Glu Lys Arg

290

295

300

atg aag atg gtg tcc cag agc atc acc cag cgc ttc cgg ctg tgc cgg 960

Met Lys Met Val Ser Gln Ser Ile Thr Gln Arg Phe Arg Leu Ser Arg

305

310

315

320

gac aag aag gtg gcc aag tgc ctg gcc atc atc gtg agc atc ttt ggg 1008

Asp Lys Lys Val Ala Lys Ser Leu Ala Ile Ile Val Ser Ile Phe Gly

325

330

335

ctc tgc tgg gcg ccg tac acg ctc cta atg atc atc cga gct gct tgc 1056

Leu Cys Trp Ala Pro Tyr Thr Leu Leu Met Ile Ile Arg Ala Ala Cys

340

345

350

cat ggc cgc tgc atc ccc gat tac tgg tac gag acg tcc ttc tgg ctt 1104

His Gly Arg Cys Ile Pro Asp Tyr Trp Tyr Glu Thr Ser Phe Trp Leu

355

360

365

ctg tgg gcc aac tgg gcc gtc aac ccc gtc ctc tac cca ctg tgc cac 1152
 Leu Trp Ala Asn Ser Ala Val Asn Pro Val Leu Tyr Pro Leu Cys His

370

375

380

tac agc ttc cgc aga gcc ttc acc aag ctc ctc tgc ccc cag aag ctc 1200
 Tyr Ser Phe Arg Arg Ala Phe Thr Lys Leu Leu Cys Pro Gln Lys Leu

385

390

395

400

aag gtc cag ccc cac gcc tcc ctg gag cag tgc tgg aag 1239
 Lys Val Gln Pro His Gly Ser Leu Glu Gln Cys Trp Lys

405

410

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
 synthesized primer sequence

<400> 3

batngccaac ctbkccttct c

21

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 4

ccataaaagn nggggttgac

20

<210> 5

<211> 2700

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (351)..(1589)

<400> 5

aattcggcac gacggggcag atcgggggc gcactcggtt gcgcgtgag ctaggggtgc 60

accgacgcac cgcggggcgc tggagctcgg ctttgctctc gctgcagcag ccgcgccgcc 120

cgccccactc cgctcagatt ccgacaccag cccccctctgg atcgccctcc tggactctag 180

ccccggctct tgctccgacc ccgcggacca tgctccgggc gccccccgga aaaccgggct 240

gggcgaagag ccggcaaaga ttaggtcac gagcgggggc cccaccggc caccagctc 300

tccgccgtg cctgcccg tgctcccgag ccgtgtgagc ctgctgggcc atg gag 356

Met Glu

1

cgc gcg cgc ccc gac ggg ctg atg aac gcg tcg ggc act ctg gcc gga 404

Arg Ala Pro Pro Asp Gly Leu Met Asn Ala Ser Gly Thr Leu Ala Gly

5

10

15

gag gcg gcg gct gca ggc ggg gcg cgc ggc ttc tcg gct gcc tgg acc 452

Glu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Arg Gly Phe Ser Ala Ala Trp Thr

20

25

30

gct gtc ctg gct gcg ctc atg gcg ctg ctc atc gtg gcc aca gta ctg 500

Ala Val Leu Ala Ala Leu Met Ala Leu Leu Ile Val Ala Thr Val Leu

35

40

45

50

ggc aac gcg ctg gtc atg ctc gcc ttc gtg gcg gat tcg agc etc cgc 548

Gly Asn Ala Leu Val Met Leu Ala Phe Val Ala Asp Ser Ser Leu Arg

55

60

65

acc cag aac aac ttc ttt ctg ctc aac ctc gcc atc tcc gac ttc ctc 596

Thr Gln Asn Asn Phe Phe Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu

70

75

80

gtg ggt gcc ttc tgc atc cca ttg tac gta ccc tat gtg ctg acc ggc 644

Val Gly Ala Phe Cys Ile Pro Leu Tyr Val Pro Tyr Val Leu Thr Gly

85

90

95

cgt tgg acc ttc ggc cgg ggc ctc tgc aag ctg tgg ctg gtg gta gac 692

Arg Trp Thr Phe Gly Arg Gly Leu Cys Lys Leu Trp Leu Val Val Asp

100

105

110

tac cta ctg tgt gcc tcc tcg gtc ttc aac atc gta ctc atc agc tat 740

Tyr Leu Leu Cys Ala Ser Ser Val Phe Asn Ile Val Leu Ile Ser Tyr

115

120

125

130

gac cga ttc ctg tca gtc act cga gct gtc tcc tac agg gcc cag cag 788

Asp Arg Phe Leu Ser Val Thr Arg Ala Val Ser Tyr Arg Ala Gln Gln

135

140

145

ggg gac acg aga cgg gcc gtt cgg aag atg gca ctg gtg tgg gtg ctg 836

Gly Asp Thr Arg Arg Ala Val Arg Lys Met Ala Leu Val Trp Val Leu

150

155

160

gcc ttc ctg ctg tat ggg cct gcc atc ctg agt tgg gag tac ctg tct 884

Ala Phe Leu Leu Tyr Gly Pro Ala Ile Leu Ser Trp Glu Tyr Leu Ser

165	170	175	
ggt ggc agt tcc atc ccc gag ggc cac tgc tat gct gag ttc ttc tac Gly Gly Ser Ser Ile Pro Glu Gly His Cys Tyr Ala Glu Phe Phe Tyr			932
180	185	190	
aac tgg tac ttt ctc atc acg gcc tcc acc ctc gag ttc ttc acg ccc Asn Trp Tyr Phe Leu Ile Thr Ala Ser Thr Leu Glu Phe Phe Thr Pro			980
195	200	205	210
ttc ctc agc gtt acc ttc ttc aac ctc agc atc tac ctg aac atc cag Phe Leu Ser Val Thr Phe Phe Asn Leu Ser Ile Tyr Leu Asn Ile Gln			1028
215	220	225	
agg cgc acc cgc ctt cgg ctt gat ggg ggc cgt gag gct ggc cca gaa Arg Arg Thr Arg Leu Arg Leu Asp Gly Gly Arg Glu Ala Gly Pro Glu			1076
230	235	240	
ccc cca cca gat gcc cag ccc tgc cca cct cca gct ccc ccc agc tgc Pro Pro Pro Asp Ala Gln Pro Ser Pro Pro Pro Ala Pro Pro Ser Cys			1124
245	250	255	
tgg ggc tgc tgg cca aaa ggg cat ggc gag gcc atg ccg ttg cac agc Trp Gly Cys Trp Pro Lys Gly His Gly Glu Ala Met Pro Leu His Ser			1172
260	265	270	

tct ggc agc tcc tca agg ggc act gag agg cca cgc tca ctc aaa agg 1220

Ser Gly Ser Ser Ser Arg Gly Thr Glu Arg Pro Arg Ser Leu Lys Arg

275

280

285

290

ggc tcc aag cca tca gca tct tca gca tcc ctg gag aag cgc atg aag 1268

Gly Ser Lys Pro Ser Ala Ser Ser Ala Ser Leu Glu Lys Arg Met Lys

295

300

305

atg gtg tcc cag agc atc acc cag cgc ttc cgg ctg tgc cgg gac aag 1316

Met Val Ser Gln Ser Ile Thr Gln Arg Phe Arg Leu Ser Arg Asp Lys

310

315

320

aag gtg gcc aag tgc ctg gcc atc atc gtg agc atc ttt ggg ctc tgc 1364

Lys Val Ala Lys Ser Leu Ala Ile Ile Val Ser Ile Phe Gly Leu Cys

325

330

335

tgg gcg ccg tac acg ctc cta atg atc atc cga gct gct tgc cat ggc 1412

Trp Ala Pro Tyr Thr Leu Leu Met Ile Ile Arg Ala Ala Cys His Gly

340

345

350

cgc tgc atc ccc gat tac tgg tac gag acg tcc ttc tgg ctt ctg tgg 1460

Arg Cys Ile Pro Asp Tyr Trp TyrGlu Thr Ser Phe Trp Leu Leu Trp

355

360

365

370

gcc aac tcg gcc gtc aac ccc gtc ctc tac cca ctg tgc cac tac agc 1508

Ala Asn Ser Ala Val Asn Pro Val Leu Tyr Pro Leu Cys His Tyr Ser

375

380

385

ttc cgc aga gcc ttc acc aag ctc ctc tgc ccc cag aag ctc aag gtc 1556
 Phe Arg Arg Ala Phe Thr Lys Leu Leu Cys Pro Gln Lys Leu Lys Val

390

395

400

cag ccc cac gcc tcc ctg gag cag tgc tgg aag tgagcagctg cccaccctt 1609
 Gln Pro His Gly Ser Leu Glu Gln Cys Trp Lys

405

410

ctgaggccag gcccttgtag ttgtttgagt gggcagccgg agcgtgggag gggccctggt 1669

ccatgctcgg ctccaaatgc catggcgccc tcttagatca tcaacccgc agtggggtag 1729

catggcaggt gggccaagag ccctagttgg tggagctaga gtgtgctggt tagctctgcc 1789

gccacattct ccttcaccac acagaagaga caatccagga gtcccaggca tgccttcac 1849

ctacacacac acacacacac acacacacac acacaccaca gtgcagtgcc agtgatgtcc 1909

ccttttgcat atttagtggt tgggtgctct cctaagcaa acctcggtgt gtgctccgg 1969

ctccggccct ggcaatgcgt gcgtagcggc tgcattgtct cacaccggc acacaccgc 2029

ccgccacaca cttgcaacac ctcctctctc ccagaagagc tggggacgat gccctttgct 2089

gccactgtct cttgcttaat cccagagcct ggctccttat cccccactct cccttcaact 2149

ctgccccaca aagtgtcgag cgcctcgga aactgaage ttctctgctc cttccactct 2209

ggatgttttc aggaagatgg aggagaagaa aacacgtctg tgaacttgat gttccttga 2269

tgtttaatca agagagacaa aattgccgag gagctcgagg ctggattggc aggtgtgggc 2329

tcccagccc tctcctca gtgtgcagc ttccgctga gccgcgccag ctgcttctgc 2389

ctgccccgcc cccaggttg ggacgatggc cctgccctgc ttgccccgctc tgtacaatca 2449

gaatttgggg gtgggtggtt atggggtaga gcgctcttc actgtgcct aaaggtcctg 2509

aggctcacag gacagtcagc aggagagcag gcaggcccgc gacacctggg aggaatgctt 2569

tgctctgcc tgtgtactca cctcaggctt ctgcatgctc tctgcccctt gtgccttgg 2629

gtgtgcctc tgccaatgtg aaaacacaat aaagtgtatt tttttacgga aaaaaaana 2689

aaaaaaaaa a 2700

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 6

cgaggatccg tgaggctccg gtgcccgtc

29

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 7

cgggtaagct tcacgacacc tgaaatggaa ga

32

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 8

ccttctgcat cccattgtac gtacc

24

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 9

cttcgccgg gccttcacca a

21

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 10

acagacacgg cggggctcac

20

<210> 11

<211> 1350

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> exon

<222> (280)..(557)

<400> 11

gcactcggct gcgcgttgc tccggctgca cggtcgcacc ggcagcggct caggtccgg 60

ctctctccc gtgcagcag ccgcctgcc ggcctcactg ggctcggatc cggccccggc 120

ccccctggca ccgcctgctc tggccccggc cccggccccg cggaccatgc gctggggccc 180

cccaggggaa cccgaccgg ccaaggggcc gcaaagacga ggctcccggg cgggggcccc 240

tcccgccgc ccagctctcg gccggcgccc tgccccgct cccggagccg cgtgagcctg 300

cggggccatg gagegcgcgc cccccgacgg gccgctgaac gcttcggggg cgctggcggg 360

cgaggcggcg gcggcgggcg gggcgcgcgg ctctcggca gcctggaccg cggctctggc 420

cgcctcatg gcctctca tcgtggccac ggtgctgggc aacgcctgg tcctctcgc 480

cttcgtggcc gactcgagcc tccgcaccca gaacaacttc ttctctca acctgccat 540

ctccgacttc ctgctcgta aatccccagc cctggccgc tggggaccca ggggcgcca 600

gcgtggccgg gccagcggg actggaacac ggacctgggt ggctccgca ggcacagcc 660

ccaccagggg acccgccctg ggaagggggc gtccggagcc catgggtgg ggggcacagg 720

cgaagtctct tgccactcag gcctcgggac aggggctggg gagagatgc cccgggaagg 780

gacacgggca ctgggcgagg cgcaaggcgc aaaggcagcg ggtgcagtc tggctcctgc 840

gctgtagcca aacaaaggct gctcgggact taggacgcgc ggaggcgca gtggggcgg 900

ttagagaagg tctgggggag gggacatgga aggggattt ttagagctgt gttgggggaa 960

gggacggtgg ggaaggtggg ggtggggga gacgctcgga ggagcgtgct ctcacgtgc 1020

caggtctgc tgccgctgg gggcggggc acgcggagg ggctggagc ccagacacct 1080

gttggggctg tgaggtgcgt ctcccagacg ctccaagccc gcttggcagt agtagtagcg 1140

gctggcggtt ggcggtgca accaagtgcc ctttcagcca ggagaaaggc tttctccttg 1200

tctaagctga gaccgagggt tgtccagcgc cagggtaggg gctggagtcc agcgggggag 1260

gggagaagga aattgtcttc tttctcctt tgagggtgg gagggctgga cagaagtcca 1320

gggaatcccg actccaggct ctcgggggtc 1350

<210> 12

<211> 448

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> exon

<222> (259)..(425)

<400> 12

gagctcccca tgcttgatc atccctcttg ccccaggcc caggggacac agatagtgt 60

gggagctatg tgggggtgaa ggctggcggc agggcagagt ttgtggctga caccaggtgg 120

aggggtggta agataggat ggctagtcc agaaaagcag ccaccatgtg accccaggtc 180

ccgcgggtgt ctgcgcttag gtccgtctgt cccctggccc ctggetgcat ggccccactg 240

tgccctact cccacaggc gccttctgca tccactgta tgtaccctac gtgctgacag 300

gccgctggac cttcggccgg ggctctctgca agctgtggct ggtagtggac tacctgctgt 360

gcacctcttc tgcttcaac atcgtctca tcagctacga ccgttctctg tggtcaccc 420

gagcggtgag tctgggctg cggagctc 448

<210> 13

<211> 1893

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> exon

<222> (293)..(1209)

<400> 13

gagctcacag ctggtagggg gtggtaaaca ggcagcctag cagagagtga gggttcaggt 60

tggtcccagg gagttctga ggctctcact gagtgtggca gggcaccagt ccgggacccc 120

agtggggagg gttagaggaa gggaggggaa agagggaggg agggaggaca ggaggggaaa 180
ggaggagcat tgctgctgag ggaaggccc acataggggc ccacaggcta cgggggcgca 240
cccagccaa tattccttc gcccgccc tgaccagcct gcccttctgc aggtctcata 300
ccggggccag cagggtgaca cgcggcgggc agtcggaag atgctgctgg tgtgggtgct 360
ggccttctg ctgtacggac cagccatcct gagctgggag tacctgtccg gggcagctc 420
catccccag ggccactgct atgccagtt cttctacaac tggtaacttc tcatacggc 480
ttccacctg gattcttta cgccttctc cagcgtcacc ttctttaacc tcagatcta 540
cctgaacatc cagaggcgca ccgcctccg gctggatggg gctcgagagg cagccggccc 600
cgagccccc cccaggccc agccctcacc acccccacc cctggctgct ggggctgctg 660
gcagaagggg cagggggagg ccatgccgt gcacaggtat ggggtgggtg aggcggcgt 720
aggcgtgag gccggggagg cgaccctcg ggggtggcgt gggggcggct ccgtggcttc 780
accacctcc agctccggca gtcctcgag gggcactgag aggcgcgct cactcaagag 840
gggtccaag ccatggcgt cctcgccctc actggagaag cgcataaga tgggtccca 900

gagcttcacc cagcgctttc ggctgtctcg ggacaggaaa gtggccaagt cgctggccgt 960

catcgtgagc atctttgggc tctgtgggc cccatacacg ctgctgatga tcatecgggc 1020

cgctgccat ggccactgcg tccctgacta ctggtagaa acctccttct ggctcctgtg 1080

ggccaactcg gctgtcaacc ctgtcctcta cctctgtgc caccacagct tccgcgggc 1140

cttcaccaag ctgctctgcc cccagaagct caaatccag cccacagct cctggagca 1200

ctgctggaag tgagtggccc accagagcct cctcageca cgctctctc agcccaggtc 1260

tctgggcat ctggccctgc tgccccctac cggctcgtt ccccagggg tgagccccgc 1320

cgtgtctgtg gccctctctt aatgccagg cagccacct gccatggagg cgccttctg 1380

ggttgccag agggccctc actggctgga ctggaggctg ggtggccgc cctgcccc 1440

acattctggc tccaccgga gggacagtct ggaggtccca gacatgtgc ccacccctg 1500

ctgggtccca ccttcgcag ttactggttg gtgttcttc caaagcaagc acctgggtgt 1560

gtccaggct tctgccta gcagtttgc tctgcagtg cacacactg cacaccctg 1620

cacacactg cacaccgtc ctctccccg acaagcccag gacactgct ttgtgcctt 1680

ctgtctcttg cataagcctc aggcctggcc cttcacccc tcttcccacc aactctctct 1740

gcccccaaaa gtgtcaaggg gccctaggaa cctcgaagct gttctctgct ttccattct 1800

gggtgttttc agaaagatga agaagaaaac atgtctgtga acttgatgtt cctgggatgt 1860

ttaatcaaga gagacaaaat tgctgaggag etc 1893

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 14

tgaacgcttc gggggcgctg 20

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 15

gagatggcga ggttgagcag g

21

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 16

ggctccaagc catcgcgctc

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 17

ctcacttcca gcagtgtcc

20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 18

gcctccgcac ccagaacaac

20

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 19

tgcgctctg gatgttcag

19

<210> 20

<211> 453

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Glu Arg Ala Pro Pro Asp Gly Pro Leu Asn Ala Ser Gly Ala Leu

1

5

10

15

Ala Gly Glu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Arg Gly Phe Ser Ala Ala

20

25

30

Trp Thr Ala Val Leu Ala Ala Leu Met Ala Leu Leu Ile Val Ala Thr

35

40

45

Val Leu Gly Asn Ala Leu Val Met Leu Ala Phe Val Ala Asp Ser Ser

50

55

60

Leu Arg Thr Gln Asn Asn Phe Phe Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp

65

70

75

80

Phe Leu Val Gly Ala Phe Cys Ile Pro Leu Tyr Val Pro Tyr Val Leu

85

90

95

Thr Gly Arg Trp Thr Phe Gly Arg Gly Leu Cys Lys Leu Trp Leu Val

100

105

110

Val Asp Tyr Leu Leu Cys Thr Ser Ser Ala Phe Asn Ile Val Leu Ile

115

120

125

Ser Tyr Asp Arg Phe Leu Ser Val Thr Arg Ala Val Ser Tyr Arg Ala

130

135

140

Gln Gln Gly Asp Thr Arg Arg Ala Val Arg Lys Met Leu Leu Val Trp

145

150

155

160

Val Leu Ala Phe Leu Leu Tyr Gly Pro Ala Ile Leu Ser Trp Glu Tyr

165

170

175

Leu Ser Gly Gly Ser Ser Ile Pro Glu Gly His Cys Tyr Ala Glu Phe

180

185

190

Phe Tyr Asn Trp Tyr Phe Leu Ile Thr Ala Ser Thr Leu Glu Phe Phe

195

200

205

Thr Pro Phe Leu Ser Val Thr Phe Phe Asn Leu Ser Ile Tyr Leu Asn

210

215

220

Ile Gln Arg Arg Thr Arg Leu Arg Leu Asp Gly Ala Arg Glu Ala Ala

225

230

235

240

Gly Pro Glu Pro Pro Pro Glu Ala Gln Pro Ser Pro Pro Pro Pro

245

250

255

Gly Cys Trp Gly Cys Trp Gln Lys Gly His Gly Glu Ala Met Pro Leu

260

265

270

His Arg Tyr Gly Val Gly Glu Ala Ala Val Gly Ala Glu Ala Gly Glu

275

280

285

Ala Thr Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Val Ala Ser Pro Thr

290

295

300

Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Arg Gly Thr Glu Arg Pro Arg Ser Leu

305

310

315

320

Lys Arg Gly Ser Lys Pro Ser Ala Ser Ser Ala Ser Leu Glu Lys Arg

325

330

335

Met Lys Met Val Ser Gln Ser Phe Thr Gln Arg Phe Arg Leu Ser Arg

340

345

350

Asp Arg Lys Val Ala Lys Ser Leu Ala Val Ile Val Ser Ile Phe Gly

355

360

365

Leu Cys Trp Ala Pro Tyr Thr Leu Leu Met Ile Ile Arg Ala Ala Cys

370 375 380

His Gly His Cys Val Pro Asp Tyr Trp Tyr Glu Thr Ser Phe Trp Leu

385 390 395 400

Leu Trp Ala Asn Ser Ala Val Asn Pro Val Leu Tyr Pro Leu Cys His

405 410 415

His Ser Phe Arg Arg Ala Phe Thr Lys Leu Leu Cys Pro Gln Lys Leu

420 425 430

Lys Ile Gln Pro His Ser Ser Leu Glu His Cys Trp Lys Lys Met Lys

435 440 445

Lys Lys Thr Cys Leu

450

<210> 21

<211> 2050

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (271)..(1629)

<400> 21

agagatgtag ggccccctt ttagctgcgc acagaacgaa agaactcggt ttttcttta 60

gtgagtgtgc ttgggtgacg cttagggcgc cctccgcagt gcgcgcagga aagcgactg 120

aggctgcgga ggcagagctg catgctgggt gcgggaagag gtgggtccg tcgcggagtc 180

gtgagtccg tgccctttta gttagtctg cagtctagta tggtecccat ttgccttcc 240

actccggag ccgcgtgagc ctgcggggcc atg gag cgc gcg ccg ccc gac ggg 294

Met Glu Arg Ala Pro Pro Asp Gly

1

5

ccg ctg aac gct tcg ggg gcg ctg gcg ggc gag gcg gcg gcg gcg ggc 342

Pro Leu Asn Ala Ser Gly Ala Leu Ala Gly Glu Ala Ala Ala Ala Gly

10

15

20

ggg gcg cgc ggc ttc tcg gca gcc tgg acc gcg gtg ctg gcc gcg etc 390

Gly Ala Arg Gly Phe Ser Ala Ala Trp Thr Ala Val Leu Ala Ala Leu

25

30

35

40

atg gcg ctg ctc atc gtg gcc acg gtg ctg ggc aac gcg ctg gtc atg 438

Met Ala Leu Leu Ile Val Ala Thr Val Leu Gly Asn Ala Leu Val Met

45

50

55

ctc gcc ttc gtg gcc gac tcg agc ctc cgc acc cag aac aac ttc ttc 486

Leu Ala Phe Val Ala Asp Ser Ser Leu Arg Thr Gln Asn Asn Phe Phe

60 65 70

ctg ctc aac ctc gcc atc tcc gac ttc ctc gtc ggc gcc ttc tgc atc 534

Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Val Gly Ala Phe Cys Ile

75 80 85

cca ctg tat gta ccc tac gtg ctg aca ggc cgc tgg acc ttc ggc cgg 582

Pro Leu Tyr Val Pro Tyr Val Leu Thr Gly Arg Trp Thr Phe Gly Arg

90 95 100

ggc ctc tgc aag ctg tgg ctg gta gtg gac tac ctg ctg tgc acc tcc 630

Gly Leu Cys Lys Leu Trp Leu Val Val Asp Tyr Leu Leu Cys Thr Ser

105 110 115 120

tct gcc ttc aac atc gtg ctc atc agc tac gac cgc ttc ctg tgc gtc 678

Ser Ala Phe Asn Ile Val Leu Ile Ser Tyr Asp Arg Phe Leu Ser Val

125 130 135

acc cga gcg gtc tca tac cgg gcc cag cag ggt gac acg cgg cgg gca 726

Thr Arg Ala Val Ser Tyr Arg Ala Gln Gln Gly Asp Thr Arg Arg Ala

140 145 150

gtg cgg aag atg ctg ctg gtg tgg gtg ctg gcc ttc ctg ctg tac gga 774

Val Arg Lys Met Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Phe Leu Leu Tyr Gly

155 160 165

cca gcc atc ctg agc tgg gag tac ctg tcc ggg ggc agc tcc atc ccc 822

Pro Ala Ile Leu Ser Trp Glu Tyr Leu Ser Gly Gly Ser Ser Ile Pro

170

175

180

gag ggc cac tgc tat gcc gag ttc ttc tac aac tgg tac ttc ctc atc 870

Glu Gly His Cys Tyr Ala Glu Phe Phe Tyr Asn Trp Tyr Phe Leu Ile

185

190

195

200

acg gct tcc acc ctg gag ttc ttt acg ccc ttc ctc agc gtc acc ttc 918

Thr Ala Ser Thr Leu Glu Phe Phe Thr Pro Phe Leu Ser Val Thr Phe

205

210

215

ttt aac ctc agc atc tac ctg aac atc cag agg cgc acc cgc ctc cgg 966

Phe Asn Leu Ser Ile Tyr Leu Asn Ile Gln Arg Arg Thr Arg Leu Arg

220

225

230

ctg gat ggg gct cga gag gca gcc ggc ccc gag ccc cct ccc gag gcc 1014

Leu Asp Gly Ala Arg Glu Ala Ala Gly Pro Glu Pro Pro Pro Glu Ala

235

240

245

cag ccc tca cca ccc cca ccg cct ggc tgc tgg ggc tgc tgg cag aag 1062

Gln Pro Ser Pro Pro Pro Pro Pro Gly Cys Trp Gly Cys Trp Gln Lys

250

255

260

ggg cac ggg gag gcc atg ccg ctg cac agg tat ggg gtg ggt gag gcg 1110

Gly His Gly Glu Ala Met Pro Leu His Arg Tyr Gly Val Gly Glu Ala

265 270 275 280

gcc gta ggc gct gag gcc ggg gag gcg acc ctc ggg ggt ggc ggt ggg 1158

Ala Val Gly Ala Glu Ala Gly Glu Ala Thr Leu Gly Gly Gly Gly Gly

285 290 295

ggc ggc tcc gtg gct tca ccc acc tcc agc tcc ggc agc tcc tcg agg 1206

Gly Gly Ser Val Ala Ser Pro Thr Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Arg

300 305 310

ggc act gag agg ccg cgc tca ctc aag agg ggc tcc aag ccg tcg gcg 1254

Gly Thr Glu Arg Pro Arg Ser Leu Lys Arg Gly Ser Lys Pro Ser Ala

315 320 325

tcc tcg gcc tcg ctg gag aag cgc atg aag atg gtg tcc cag agc ttc 1302

Ser Ser Ala Ser Leu Glu Lys Arg Met Lys Met Val Ser Gln Ser Phe

330 335 340

acc cag cgc ttt cgg ctg tct cgg gac agg aaa gtg gcc aag tcg ctg 1350

Thr Gln Arg Phe Arg Leu Ser Arg Asp Arg Lys Val Ala Lys Ser Leu

345 350 355 360

gcc gtc atc gtg agc atc ttt ggg ctc tgc tgg gcc cca tac acg ctg 1398

Ala Val Ile Val Ser Ile Phe Gly Leu Cys Trp Ala Pro Tyr Thr Leu

365 370 375

ctg atg atc atc cgg gcc gcc tgc cat ggc cac tgc gtc cct gac tac 1446

Leu Met Ile Ile Arg Ala Ala Cys His Gly His Cys Val Pro Asp Tyr

380

385

390

tgg tac gaa acc tcc ttc tgg ctc ctg tgg gcc aac tgc gct gtc aac 1494

Trp Tyr Glu Thr Ser Phe Trp Leu Leu Trp Ala Asn Ser Ala Val Asn

395

400

405

cct gtc ctc tac cct ctg tgc cac cac agc ttc cgc cgg gcc ttc acc 1542

Pro Val Leu Tyr Pro Leu Cys His His Ser Phe Arg Arg Ala Phe Thr

410

415

420

aag ctg ctc tgc ccc cag aag ctc aaa atc cag ccc cac agc tcc ctg 1590

Lys Leu Leu Cys Pro Gln Lys Leu Lys Ile Gln Pro His Ser Ser Leu

425

430

435

440

gag cac tgc tgg aaa aag atg aag aag aaa aca tgt ctg tgaacttgat 1639

Glu His Cys Trp Lys Lys Met Lys Lys Lys Thr Cys Leu

445

450

gttcttgga tgtttaatca agagagacaa aattgctgag gagctcaggg ctggattggc 1699

aggtgtgggc tcccagccc tctccctec gctaaggett ccggtgagc tgtgccagct 1759

gcttctgccc acccgcctc tgggtcaca ccagccctgg tggccaagcc tgccccggcc 1819

actctgtttg ctcaccagg accctctgggg gttgttgga ggagggggcc cggctgggccc 1879

cgagggtccc aaggcgtgca ggggcggtcc agaggagggtg cccgggcagg ggccgcttcg 1939

ccatgtgctg tgcaccgtg ccacgcgtc tgcattgtcc tctgcctgtg cccgtgcgc 1999

tgccctgcaa accgtgaggt cacaataaag tgtatttttt tattggtgct g 2050

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 22

tgcatcccat tgtacgtacc

20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 23

atcattagga gcgtgtangg

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 24

tgctctggga caccatcttc

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/05967

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁶ C12N15/12, C12N15/63, C12Q1/02, C12P21/08, C07K14/705,
C07K16/28, C12N1/21, C12N1/19, C12N5/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁶ C12N15/12, C12N15/63, C12Q1/02, C12P21/08, C07K14/705,
C07K16/28, C12N1/21, C12N1/19, C12N5/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), EMBL/DDBJ/GenBank/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Bonner, T.I. et al., "Identification of a Family of Muscarinic Acetylcholine Receptor Genes" Science (1987) Vol. 237 p.527-532	1, 3, 5-14
Y	Dewan, Z. et al., "Molecular characterization of a rat arufa2B-adrenergic receptor" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) Vol. 87, No. 8 p.3102-3106	1, 3, 5-14
Y	JP, 7-67654, A (Mitsubishi Kagaku Bio-Chemical Laboratories, Inc.), 14 March, 1995 (14. 03. 95) (Family: none)	2, 4, 5-14
Y	Ernest, G.P. et al., "Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors" The ENBO J. (1987) Vol. 6, No. 13 p.3923-3929	2, 4-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

*

Special categories of cited documents:

"A"

document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E"

earlier document but published on or after the international filing date

"L"

document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O"

document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P"

document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 March, 1999 (12. 03. 99)

Date of mailing of the international search report

30 March, 1999 (30. 03. 99)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/05967

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Thomas, B. et al., "A Novel Subtype of Muscarinic Receptor Identified by Homology Screening" Biochim. Biophys. Res. Commun. (1987) Vol. 149, No. 1 p.125-132	1-14
A	Maria, F.B. et al., "Normalization and Subtraction: Two Approaches to Facilitate Gene Discovery" Genome Res. (1996) Vol. 6, No. 9 p.791-806	1-14

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP98/05967

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/12, C12N15/63, C12Q1/02, C12P21/08,
C07K14/705, C07K16/28, C12N1/21, C12N1/19, C12N5/12

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/12, C12N15/63, C12Q1/02, C12P21/08,
C07K14/705, C07K16/28, C12N1/21, C12N1/19, C12N5/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), EMBL/DDBJ/GenBank/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Bonner, T. I. et al. "Identification of a Family of Muscarinic A cetylcholine Receptor Genes" Science (1987) 第237巻 p. 527-53 2	1, 3, 5-14
Y	Dewan, Z. et al. "Molecular characterization of a rat arufa2B-a drenergic receptor" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 第87巻 第8 号 p. 3102-3106	1, 3, 5-14
Y	JP, 7-67654, A (株式会社三菱化学ビーシーエル) 14. 3月. 1995 (14. 03. 95) ファミリーなし	2, 4, 5-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に基き提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他、特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 03. 99

国際調査報告の発送日

30.03.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富士 良宏

印

4 B

9 5 4 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Ernest, G. P. et al. "Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors" The ENBO J. (1987) 第6巻 第13号 p. 3923-3929	2, 4-14
Y	Thomas, B. et al. "A Novel Subtype of Muscarinic Receptor Identified by Homology Screening" Biochim. Biophys. Res. Commun. (1987) 第149巻 第1号 p. 125-132	1-14
A	Maria, F. B. et al. "Normalization and Subtraction: Two Approaches to Facilitate Gene Discovery" Genome Res. (1996) 第6巻 第9号 p. 791-806	1-14

This Page Blank (uspto)